

**Apoptose neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen:
in vivo Untersuchungen zur Regulation adulter Neurogenese**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

- Biologie und Vorklinische Medizin -

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Manfred Biebl

aus Neustadt/WN

Regensburg

2003

meinen Eltern

Promotionsgesuch eingereicht am: 5. Februar 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juni 2003

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Stephan Schneuwly und Prof. Dr. Jürgen Winkler

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. A Kurtz

1. Prüfer (Erstgutachten): Prof. Dr. S. Schneuwly

2. Prüfer (Zweitgutachten): Prof. Dr. J. Winkler

3. Prüfer: Prof. Dr. I. Neumann

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung.....	1
1. Entdeckung der Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn	1
2. Adulte Neurogenese.....	2
3. Apoptose.....	10
4. Zielsetzung.....	15
II. Material und Methoden.....	16
1. Material und Bezugsquellen.....	16
1.1. Chemikalien	16
1.2. Enzyme.....	16
1.3. Antikörper	17
1.4. Tiere	17
2. Puffer und Lösungen.....	18
2.1. Puffer und Medien.....	18
2.2. Färbelösungen	19
2.3. Allgemeine histologische Lösungen	20
3. Histologie.....	21
3.1. Histochemie.....	21
3.1.1. Nissl-Färbung.....	21
3.1.2. DAPI-Färbung.....	21
3.2. Immunhistochemie	22
3.2.1. Immunfärbungen.....	22
3.2.2. α BrdU-Färbung.....	22
3.2.3. TUNEL-Färbung.....	23
3.2.4. TUNEL-Mehrfachmarkierungen.....	23
3.3. <i>In situ</i> Hybridisierung.....	25
3.3.1. <i>In vitro</i> Transkription von mit DIG-markierter RNA	25
3.3.2. Hybridisierung.....	25

4. Isolierung von Nukleinsäuren.....	27
4.1. Isolierung von DNA.....	27
4.2. Isolierung von RNA.....	27
4.3. Analyse der Nukleinsäuren.....	27
4.3.1. Photometrisch.....	27
4.3.2. Agarosegele.....	27
5. PCR-Techniken.....	28
5.1. LM-PCR.....	28
5.2. RT-PCR	29
6. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	30
6.1. Gewinnung der DNA	30
6.2. Klonierung und Plasmid-Isolierung.....	31
6.3. DNA-Sequenzierung.....	31
7. Western Blotting	31
8. Gewebeaufarbeitung.....	31
8.1. Perfusionsfixierung.....	31
8.2. Gehirnentnahme	32
8.3. Herstellung von Gewebeschnitten	32
8.3.1. Gelatine-Beschichtung von Objektträgern	32
8.3.2. Schneiden am Schlittenmikrotom.....	33
8.3.3. Schneiden am Kryostat.....	33
9. <i>In vivo</i> Experimente zur Modulation der Apoptose neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen.....	33
9.1. Injektion eines Caspase-Inhibitors in den Seitenventrikel.....	33
9.2. Analyse transgener Mäuse (Apoptose-Protektion durch Bcl-2 Überexpression)	36
10. Auswertung.....	37
10.1. Mikroskopie.....	37
10.2. Definition der Auswertungsareale.....	37
10.2.1. Inhibitor-injizierte Ratten.....	37
10.2.2. Bcl-2 transgene Mäuse.....	37
10.3. Quantifizierung.....	38
10.4. Qualitative Auswertung.....	38

III. Ergebnisse	39
1. Quantifizierung von Zellproliferation in Bulbus olfactorius und Gyrus dentatus adulter Ratten	39
2. Nachweis von Apoptose im adulten Rattengehirn.....	40
2.1. DNA-Leiter (LM-PCR)	40
2.2. TUNEL	41
3. Quantifizierung von Apoptose im adulten Rattengehirn und deren Verteilung.....	43
3.1. Quantifizierung von Apoptose im adulten Rattengehirn	43
3.2. Verteilung apoptotischer Zellen im adulten Rattengehirn	43
4. Nachweis von Caspasen im System SVZ/RMS/BO im Gehirn adulter Ratten	45
4.1. RT-PCR.....	45
4.2. Klonierung einer Nedd 2 Splicevarianten.....	46
4.3. <i>In situ</i> Hybridisierung	48
4.4. Nachweis der Aktivierung von Caspase 3.....	50
4.4.1. Western Blot	50
4.4.2. Immunhistologischer Nachweis.....	51
5. Charakterisierung sterbender Zellen	52
6. Modulation des Zelltodes in Zonen der Neurogenese	53
6.1. Infusion eines Caspase-Inhibitors in den Seitenventrikel.....	53
6.1.1. Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen.....	53
6.1.1.1. Gyrus dentatus	53
6.1.1.2. SVZ/RMS/BO	54
6.1.2. Zelltod.....	56
6.1.2.1. Gyrus dentatus	56
6.1.2.2. SVZ/RMS/BO	58
6.1.3. Versuch der Identifizierung sterbender Zellen.....	61
6.2. Analyse transgener Bcl-2 überexprimierender Mäuse.....	61
6.2.1. Volumen, Zellzahl und Zelldichte der Granulärzell- schichten von Gyrus dentatus und Bulbus olfactorius	61
6.2.2. Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen.....	63
6.2.3. Zelltod	68
6.2.4. Neurogeneserate.....	70

IV. Diskussion	72
1. Überproduktion neuer Zellen in Zonen adulter Neurogenese.....	72
2. Apoptose ist ein häufiges Ereignis in Zonen der Neurogenese.....	74
3. Zellzuwachs oder Zellersatz?.....	76
4. Caspase 2, Caspase 3 und Caspase 9 spielen entscheidende Rolle bei der Apoptose in Zonen der Neurogenese	79
5. Injektion eines Caspase-Inhibitors führt zu deutlicher Senkung der Apoptoserate in Zonen der Neurogenese	81
6. Analyse Bcl-2 überexprimierender Mäuse zeigt erhöhtes Überleben neugeborener Zellen im Hippocampus.....	84
V. Zusammenfassung.....	87
VI. Literaturverzeichnis.....	89
VII. Abkürzungsverzeichnis.....	108

I. Einleitung

1. Entdeckung der Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn

Eine weit verbreitete und allgemein anerkannte Vorstellung war lange Zeit das Fehlen jeglicher Neubildung von Nervenzellen im adulten Säugergehirn. Dieses Dogma der Neurowissenschaften war auf Studien zurückzuführen, die am Ende des 19. Jahrhunderts bzw. Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt wurden. So beschrieben einige der führenden Neurowissenschaftler der damaligen Zeit detailliert die Entwicklung des Nervensystems von Säugetieren (Koelliker, 1896; His, 1904; Ramón y Cajal, 1899 - 1904). Die Beobachtungen, dass das Gehirn sehr bald nach der Geburt seine endgültige Struktur erreichte und sein Erscheinungsbild während des Lebens nicht änderte, sowie das Fehlen von mitotischen Teilungsstadien im adulten Gehirn, führten sehr schnell zu der dogmatischen These, die Santiago Ramón y Cajal 1913 wie folgt formulierte:

„ ... in adult centres the nerve paths are something fixed, ended, immutable. Everything may die, nothing may be regenerated. It is for science of the future to change, if possible, this harsh decree.“

Doch bereits in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurden immer wieder Studien veröffentlicht, die dieser Lehrmeinung widersprachen. So postulierte Schaper (1897) die Existenz von undifferenzierten Zellen im adulten Gehirn höherer Vertebraten, die sowohl glial als auch neuronal ausdifferenzieren können. Diese Meinung wurde durch Befunde, wie die Teilung bestimmter Neurone im Gehirn läsionierter Meerschweinchen (Levi, 1898), dem Auffinden von mitotischen Teilungsstadien im Cerebrum von 120 Tage alten Ratten (Allen, 1912) und der Zunahme der Anzahl an cortikalen Neuronen während der ersten 20 Lebenstage (Sugita, 1918) unterstützt. All diesen Studien war jedoch gemeinsam, dass es nicht möglich war, endgültig zwischen sich teilender Neuroglia und Neuronen zu unterscheiden.

In den 60er Jahren veröffentlichte Joseph Altman (1962, 1963, 1965, 1966, 1969) eine Reihe von Artikeln, in denen der Autor unter Verwendung von [³H]-Thymidin Autoradiographien zeigte, dass es Zellneubildungen in unterschiedlichen Regionen des adulten Rattengehirns gibt. Den definitiven Nachweis adulter Neurogenese lieferte Michael Kaplan jedoch erst 15 Jahre nach Altmans erster Veröffentlichung, indem er den

autoradiographisch markierten Zellen unter dem Elektronenmikroskop eine neuronale Ultrastruktur zuweisen konnte (Kaplan, 1977). Der endgültige Nachweis von Nervenreubildung im adulten Gehirn von Primaten bzw. Menschen (Gould, 1999a; Kornack, 1999; Eriksson, 1998) gelang allerdings erst in den 90er Jahren mit der Einführung neuer Techniken, wie der BrdU-Markierung und der Immunhistochemie.

2. Adulte Neurogenese

Regionen adulter Neurogenese

Zum heutigen Zeitpunkt kennt die Wissenschaft zwei Hauptregionen im adulten Gehirn von Säugern, in denen während der gesamten Lebensspanne Zellproliferation stattfindet und die daraus resultierenden Zellen neuronal ausdifferenzieren können. Dies sind zum einen der Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus und zum anderen die subventrikuläre Zone (SVZ) des Seitenventrikels (Abb.1; Altman, 1962; Kaplan, 1977).

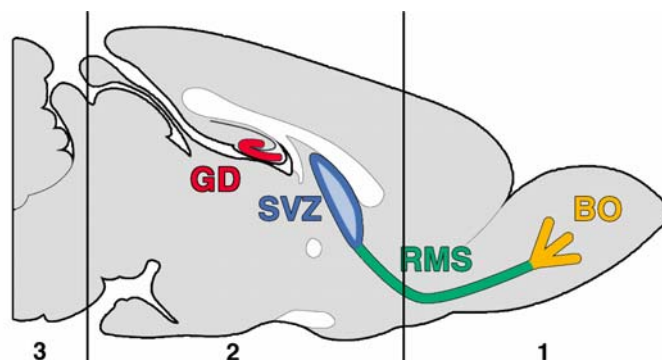


Abb. 1: Längsschnitt durch ein adultes Rattengehirn

Zonen der Neurogenese sind farbig markiert. BO: Bulbus olfactorius; GD: Gyrus dentatus; RMS: rostraler migratorischer Strom; SVZ: subventrikuläre Zone (Kuhn, 1999; modifiziert)

Im Falle des Hippocampus teilen sich, während der ganzen Lebensspanne eines Individuums, Zellen in einer dünnen Schicht zwischen Hilus und der Granulärzellschicht (GCL) des GD.

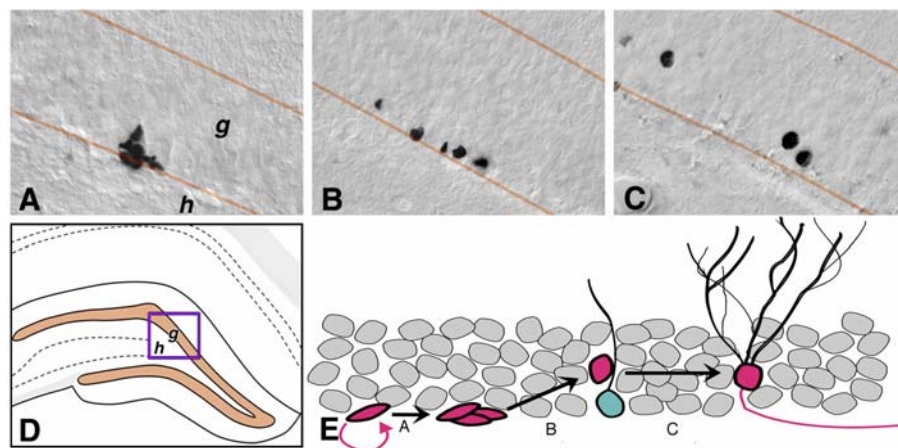


Abb. 2: Proliferation im GD

Lichtmikroskopische Aufnahmen von BrdU-positiven Zellen, bei denen die Schritte (E) der Nervenreuebildung im GD (D) erkennbar sind: Proliferation (A) an der Grenze von Hilus (h) und GCL (g), Migration (B) der neugebildeten Zellen in der GCL und Differenzierung (C) zu neuen Nervenzellen.

(Kuhn, 1996; Gage, 2000; modifiziert)

Eine Vielzahl von Experimenten wies darauf hin, dass hier täglich eine Produktion von mindestens mehreren hundert Zellen stattfindet (Bayer, 1982). Von diesen Zellen, die durch Bromdesoxyuridin (BrdU), einem Proliferationsmarker, visualisiert werden können, wandert in den folgenden 4 Wochen ca. die Hälfte in die GCL ein, wo sodann eine neuronale Differenzierung erfolgt (Abb.2). Weitere 15% dieser Zellen entwickeln sich zu glialen Zellen. Wohingegen den restlichen 35% der Zellen im Rahmen dieser Studie keine eindeutige Zugehörigkeit zu einem Zelltypus nachgewiesen werden konnte (Gage, 1998).

Ein quantitativ viel höheres Proliferationspotential findet sich im System SVZ/RMS/BO (Abb.3). Aufgrund der räumlichen Trennung von Proliferation, Migration und Differenzierung der neuen Nervenzellen ist es ein ideales Modellsystem zur Untersuchung adulter Neurogenese. In diesem System ist die Proliferation größtenteils auf die Subependymalschicht des Seitenventrikels beschränkt.

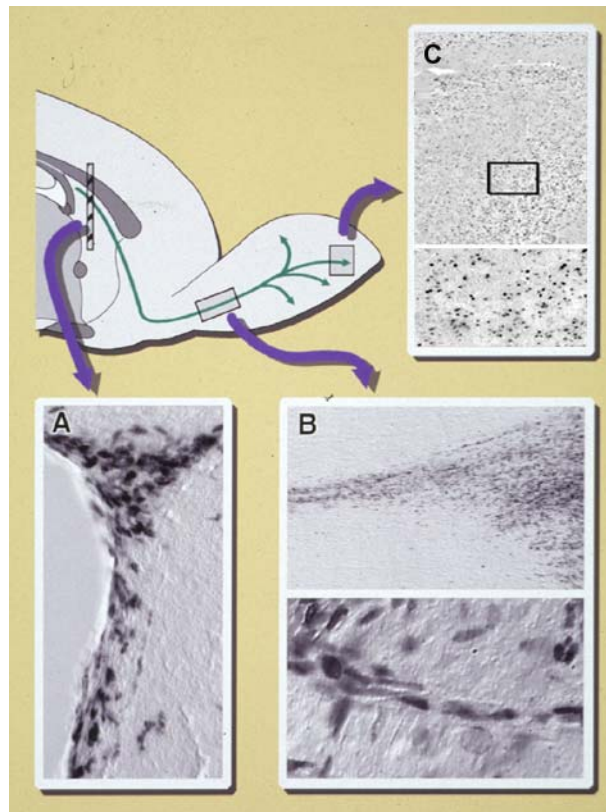


Abb.3: Proliferation im olfaktorischen System

Lichtmikroskopische Aufnahmen von BrdU-positiven Zellen. Hier ist besonders deutlich die räumliche Trennung von Proliferation in der SVZ (A), Migration durch den RMS (B) und Differenzierung im BO (C) zu erkennen.

(bereitgestellt von H.G. Kuhn; modifiziert)

Bei dieser Subependymalschicht handelt es sich um ein Residuum der Wand des Neuralrohrs. Diese stellt während der Embryonalentwicklung die Proliferationszone des Nervensystems dar und ist verantwortlich für die Produktion sämtlicher Nervenzellen des Gehirns. Die Zellen wandern von hier aus über den RMS, in dem die letzten Teilungen vollendet werden, in den BO (Altman, 1969). Diese Migration erfolgt in einer Astrozytenscheide, durch welche sich, die bis jetzt noch undifferenzierten neuronalen Vorläuferzellen, mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen (PSA-NCAM) aneinander nach vorne schieben (Rousselot, 1995; Lois, 1996; Doetsch, 1997). Hierbei wird eine Distanz von mehreren Millimetern überwunden. Zur Bewältigung dieser Strecke brauchen die Zellen, je nach Spezies, zwischen 7 und 14 Tagen. Nach ihrer Ankunft im BO erfolgt die Differenzierung der Zellen. In diesem Zusammenhang zeigten Studien, dass ca. 96% der sich im BO differenzierenden, neugeborenen Zellen sich tatsächlich zu granulären bzw. periglomerulären Neuronen entwickeln (Abb.4; Kuhn, 1997).

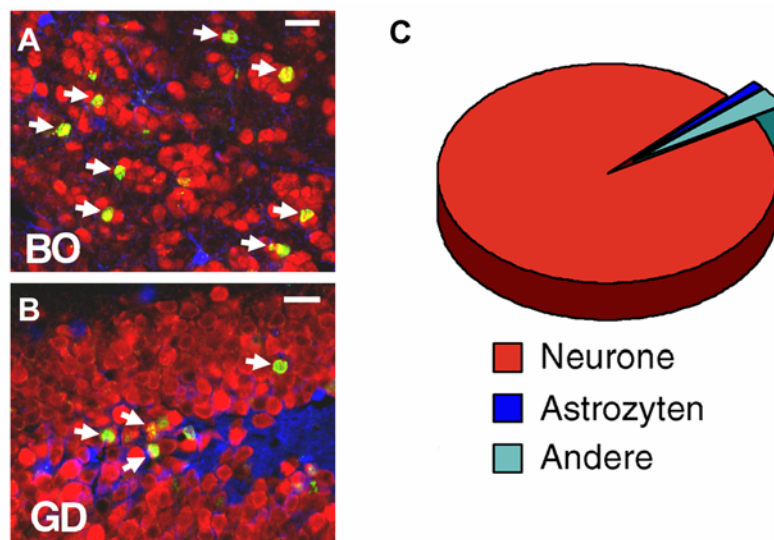


Abb.4: Differenzierungsverteilung neugebildeter Zellen

Fluoreszenzaufnahmen (konfokale Lasermikroskopie), die die unterschiedliche Differenzierung von neugebildeten BrdU-positiven Zellen (grün) in BO (A) und GD (B) aufzeigen. Neuronale Zellen (NeuN) zeigen eine rote und gliale Zellen (S100β) eine blaue Färbung. (C) Verteilungsschema zur Verdeutlichung der primären neuronalen Differenzierung der neugebildeten Zellen. (Balken: 20 µm)

(Biebl, 2000; modifiziert)

In letzter Zeit wurden einschlägige Studien veröffentlicht, die über ein Vorkommen neugeborener Neuronen in weiteren Strukturen (z.B. Neocortex, Amygdala) des Primatengehirns berichten (Gould, 1999b; Bernier, 2002). Dabei ist jedoch der Ursprung dieser Zellen immer noch ungeklärt, da die vorliegenden Forschungsbefunde keine Aufklärung bieten.

Regulation adulter Neurogenese

Mittlerweile wurde auch eine Anzahl von Einflussfaktoren identifiziert, die *in vivo* regulativ in die Neurogenese eingreifen. So zeigten Untersuchungen, dass Nager die in einer reizreichen Umgebung gehalten wurden, oder die Möglichkeit einer permanenten physischen Aktivität erhielten, eine verstärkte Bildung neuer Nervenzellen aufwiesen (Kempermann, 1997a; van Praag, 1999). Auch das Alter bzw. genetische Prädispositionen, sowie die Ernährung nehmen großen Einfluß auf das Neurogenesepotential (Kuhn 1996; Kempermann, 1997b; Lee, 2002).

Neben diesen Faktoren sind auch Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren beschrieben, die an der Regulation der adulten hippocampalen Neurogenese beteiligt sind. Obwohl wahrscheinlich eine Vielzahl von Hormonen hier mitwirken könnte, wurde bisher nur der inhibitorische Effekt von Glucocorticoiden und eine Förderung der Proliferation durch Östrogen nachgewiesen (Gould, 1992; Gould, 1994; Tanapat 1999). Um den hemmenden Effekt von Glucocorticoiden zu zeigen, wurde die Freisetzung des Hormons durch Ausschalten der adrenergen Stimulation inhibiert, was einen Anstieg der Zellproliferation zur Folge hatte. Auch die Manipulation des Aktivierungszustandes des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors (Subtyp des Glutamat-Rezeptors) zeigt einen deutlichen Einfluss auf die Neurogenese. So findet sich nach seiner Aktivierung sehr schnell ein Rückgang der Proliferationsrate und umgekehrt (Cameron, 1995; Cameron, 1998). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es nicht verwunderlich, dass Stress zu einer Reduktion der Neurogenese führt. Denn Stress führt zu einer erhöhten Freisetzung, sowohl von erregenden Neurotransmittern, als auch von Glucocorticoid-Hormonen aus der Nebenniere (Gould, 1997). Im Gegensatz hierzu kann in *in vivo* Modellen für Schlaganfall (Liu, 1998; Takagi, 1999) und Epilepsie (Parent, 1997) im GD eine erhöhte Teilungsaktivität neuronaler Vorläuferzellen festgestellt werden.

Eine eminente Rolle bezüglich des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens kann den Wachstumsfaktoren zugewiesen werden. Studien belegen, dass ihre intraventrikuläre Infusion enorme Auswirkungen auf das Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten haben (Craig, 1996; Kuhn, 1997). Die Infusion von EGF (*epidermal growth factor*) bewirkte einen starken Effekt bezüglich der Proliferation in der SVZ, nicht jedoch in der GCL des GD. Obwohl kein längerfristiges Überleben der Zellen zu beobachten war, konnte eine Veränderung der Differenzierung nachgewiesen werden. Es wurde eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen glialer und neuronaler Differenzierung, zugunsten glialer, festgestellt. FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) dagegen förderte Proliferation, Überleben und neuronale Differenzierung im System SVZ/RMS/BO, jedoch nicht im Hippocampus (Kuhn, 1997). Des Weiteren wurde dokumentiert, dass die Infusion von BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) bzw. IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) eine deutliche Erhöhung der Anzahl neugebildeter Neuronen im BO bzw. GD nach sich zieht (Zigova, 1998; Åberg, 2000).

Funktionelle Bedeutung adulter Neurogenese

Über die Funktion des Phänomens der adulten Neurogenese lässt sich bis heute nur spekulieren. Dass es sich bei den neu gebildeten Neuronen im Hippocampus um voll

funktionsfähige und integrierte Zellen handelt, konnte kürzlich nachgewiesen werden (van Praag, 2002). Bleibt nur noch über die Bedeutung, d.h. die Gründe für dieses Phänomen zu spekulieren. So wird dem Hippocampus eine zentrale Rolle für kognitive Funktionen zugeschrieben. Ob die Nervenneubildung in diesem Bereich jedoch damit in Zusammenhang steht, wird zwar immer wieder vermutet (Shors, 2000), bedarf aber noch eines endgültigen Beweises. Es gibt Hinweise, wie z.B. ein verbessertes Abschneiden bei Verhaltenstests nach einer Stimulation der Neurogenese durch ein reizreiches Umfeld (Kempermann, 1997a), Korrelation zwischen Lernfähigkeit und genetisch dispositionierter Neurogeneserate (Kempermann, 2002), Zunahme der Neurogenese in Zusammenhang mit hippocampus-abhängigen Lernen (Gould, 1999c) oder die Nervenneubildung im dorso-medialen Striatum (für das Erlernen von Liedern verantwortliche Gehirnstruktur) von Kanarienvögeln (Goldman, 1983). Der direkte, kausale Zusammenhang konnte jedoch bis heute nicht bewiesen werden. Die Möglichkeit eines Zusammenhangs zwischen hochspezialisierten Strukturen im Gehirn einer Spezies und Neurogenese stellt eine wichtige, noch zu überprüfende Hypothese dar.

Ebenso wie das Gesangszentrum bei Kanarienvögeln stellt das olfaktorische System bei Nagern eine in sehr hohem Maße spezialisierte Region dar. Die Möglichkeit eines funktionellen Zusammenhangs wird durch Befunde wie die Reduktion von Neurogenese nach Verschluss eines Nasenlochs bei Ratten (Corotto, 1994) bzw. der Auffüllung der hierdurch hervorgerufenen Zellverminderung im BO nach Wiederöffnung bestärkt (Cummings, 1997). Eine weitere Studie (Rochefort, 2002) zeigte eine erhöhte Überlebensrate - jedoch keine erhöhte Proliferation - von neugebildeten Neuronen im BO von Mäusen, wenn sie einer geruchsreicheren Umgebung ausgesetzt werden. Hierbei wird kein Einfluss auf die Neurogenese im Hippocampus festgestellt. Untersuchungen bei trächtigen bzw. sterilisierten, frisch verpaarten Mäusen dokumentierten auch eine deutlich stimulierte Neurogenese im olfaktorischen System (Shingo, 2003). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Neurogenese bei Verhaltensweisen wie Partnerwahl oder Paarung bzw. Schwangerschaft eine bedeutende Rolle spielen könnte.

Nicht zu übersehen ist der Befund, dass nach Gehirnschädigungen wie z.B. Schlaganfall (Liu, 1998), epileptischer Anfall (Parent, 1997) oder selektiver kortikaler Läsion (Magavi, 2000) unter anderem auch eine Zunahme der Neurogeneserate festzustellen ist. Dies könnte auf einen limitierten Reparaturmechanismus hindeuten.

In vitro Untersuchungen adulter Neurogenese

Neben der *in vivo* Analyse setzt sich ein weiterer Zweig der Neurogeneseforschung mit der Kultivierung und Charakterisierung neuronaler Stammzellen *in vitro* auseinander. Zellen, die aus dem Hippocampus bzw. der SVZ adulter Mäuse oder Ratten isoliert wurden, konnten mit EGF oder FGF-2 expandiert werden und differenzierten nach Entzug dieser Wachstumsfaktoren aus (Reynolds, 1992). Anhand von Transplantationsexperimenten war es möglich zu zeigen, dass Vorläuferzellen aus dem adulten Hippocampus, die keine neuronale Ausprägung aufwiesen und ein Jahr in Zellkultur gehalten wurden, nach Implantation zurück in den Hippocampus einer adulten Ratte, ausdifferenzierten, und zwar sowohl neuronal, als auch glial (Gage, 1995). Diese Zellen konnten ebenso in die SVZ bzw. RMS implantiert werden, von wo aus sie in die GCL des BO einwanderten und neuronal ausdifferenzierten (Suhonen, 1996). Weitere Studien zeigten, dass es auch möglich war, aus anderen Regionen des Gehirns (Striatum, Septum, Neocortex, Nervus opticus) pluripotente Stammzellen zu isolieren, die sich in ihren Eigenschaften in keiner Weise von Stammzellen unterschieden, die aus Neurogenesezonen isoliert wurden (Palmer, 1995; Palmer, 1999).

Eliminierung überschüssiger Zellen

Der Gedanke einer ständigen Neubildung an Nervenzellen im adulten Gehirn wirft die Frage nach dem Schicksal dieser Zellen auf. Tatsache ist, dass die Zielstrukturen beider proliferativen Zonen ein lebenslanges Wachstum aufzeigen. So wächst im Gehirn einer Ratte die GCL des BO zwischen dem 3. und dem 31. Lebensmonat um 7,5 Millionen Zellen (Kaplan, 1985) und die GCL des GD zwischen dem 1. und dem 13. Lebensmonat um ca. 375000 Zellen (Bayer, 1982a; Bayer, 1982b). Dies würde eine tägliche Produktion von ca. 9000 Zellen in der SVZ bzw. ungefähr 1000 Zellen im GD bedeuten. Obwohl bisher keine exakten Quantifizierungen der realen täglichen Produktion an neuen Zellen in diesen Regionen durchgeführt wurden, deutet eine Reihe von Untersuchungen darauf hin, dass die Zahl der Zellneubildungen die Zellzunahme deutlich übersteigt (Kaplan, 1985; Bayer, 1982a; Bayer, 1982b). Diese Differenz legt nahe, dass der täglichen Proliferation ein Eliminierungsprozess gegenüberstehen muss, um eine vermeintliche Überproduktion zu vermeiden. Hauptwerkzeug dieser Eliminierung könnte, ebenso wie während der Embryonalentwicklung, die Apoptose sein. Hier folgt der ursprünglichen Überproduktion an Nervenzellen eine drastische Reduktion, bei der bis zu 50 % der gebildeten Nervenzellen wieder verloren gehen. Das Überleben von Neuronen wird durch

Wechselwirkungen mit ihren Zielzellen reguliert. Dabei spielt die Herstellung einer korrekten synaptischen Verschaltung und die damit einhergehende Konkurrenz um neurotrophe Faktoren eine große Rolle. Sie bewirken möglicherweise eine Unterdrückung des Zelltodprogramms bei postmitotischen Zellen. Es konnte bisher eine Reihe solcher neurotrophen Faktoren, wie z.B. NGF (*nerve growth factor*), BDNF, NT-3 (*neurotrophin-3*) und CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) identifiziert werden, von denen jeder das Überleben getrennter Gruppen von Neuronen fördert (Oppenheim, 1991). Eine Störung in diesem Gleichgewicht kann zu enormen Missbildungen des Gehirns führen. So zeigten Embryonen von Knockout-Ratten, in denen die Aktivierung von Caspase 3 (Kuida, 1996) bzw. Caspase 9 (Kuida, 1998) zwei zentralen Enzymen der apoptotischen Kaskade unterdrückt war, schwere Deformierungen des Cerebrums bzw. eine Vielzahl von Hyperplasien. Der Vergleich mit der embryonalen Zelleliminierung wird darüber hinaus dadurch unterstützt, dass es sich bei der SVZ entwicklungsgeschichtlich um das Residuum der Wand des Neuralrohrs, der Proliferationszone des embryonalen Nervensystems, handelt.

Ein vergleichbares Gleichgewicht zwischen Neurogenese und Apoptose ist in einer Reihe von adulten Invertebraten und Vertebraten zu festzustellen. Es ist nachweisbar, dass in manchen Crustaceen (*Homarus americanus*; Harzsch, 1999) und Knochenfischen (*Apteronotus leptorhynchus*; Zupanc, 1999) ein lebenslanger neuronaler Zellumsatz in definierten Regionen des Gehirns stattfindet. Ein ebensolcher Zellumsatz findet sich auch im olfaktorischen Epithelium adulter Säugetiere (Calof, 1996). Dieses einzigartige, allerdings im peripheren Nervensystem gelegene, Modellsystem wird häufig verwendet, um die Interaktion von Neurogenese und Apoptose bei der Regulation der Neuronenzahl, während der Embryonalentwicklung bzw. bei Regenerationsprozessen zu untersuchen.

3. Apoptose

Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose

Der Tod eukaryotischer Zellen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen Nekrose und Apoptose, die jeweils durch eine Vielzahl unterschiedlicher morphologischer und biochemischer Faktoren gekennzeichnet sind. Bei der Nekrose handelt es sich um einen pathologischen Prozess (Trump, 1965), der durch eine Vielzahl physikalischer oder chemischer Ereignisse (z.B. O₂-Unterversorgung, Gifte, hohe Temperaturen, Viren oder Traumata) ausgelöst werden kann. Nach der Induktion kommt es zu einer Beeinträchtigung der Homöostase und zu einer Störung des Ionenhaushalts der Zelle. Das daraus resultierende Anschwellen der Zellorganellen bzw. der ganzen Zelle führt, zusammen mit der Aktivierung degradierender Enzyme, zu Fehlfunktionen und zum Zerfall der Zytoplasmamembran mit anschließender Zelllyse. Diese Freisetzung der Zellinhaltsstoffe wiederum löst eine lokale inflammatorische Reaktion aus.

Bei der Apoptose handelt es sich um einen Typus des Zelltods, der unter normalen physiologischen Bedingungen stattfindet und an dem die Zelle aktiv ihr Schicksal mitbestimmt (Kerr, 1972).

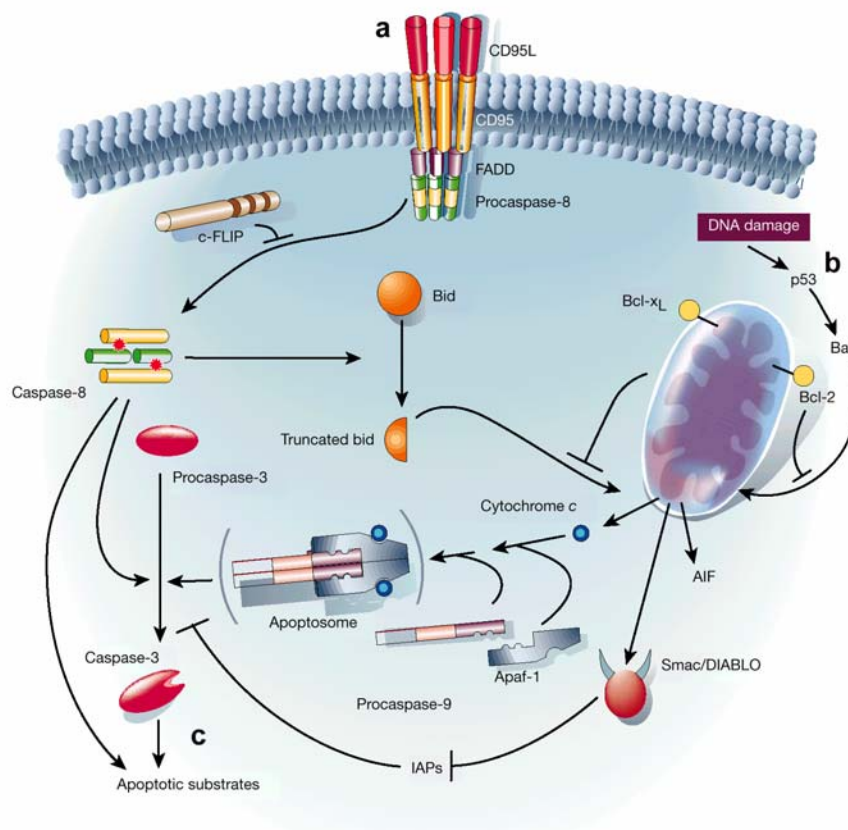


Abb.5: Darstellung der beiden Hauptwege der Apoptose in Säugetierzellen

Sowohl der rezeptor-induzierte (a) als auch der mitochondriale (b) Weg führen nach Durchlauf einer Kaskade unter anderem zur Aktivierung von Caspase 3 (c), was die Proteolyse einer Reihe apoptotischer Substrate und die Degradierung der Zelle zur Folge hat. (Hengartner, 2000; modifiziert)

Sie ist ein fester Bestandteil u.a. der Embryogenese, der Immunantwort und des normalen Zellumsatzes vieler Strukturen.

In der Literatur werden 2 Hauptwege der Apoptose beschrieben (Abb. 5; Hengartner, 2000). Zum einen erfolgt die Induktion des Zelltods über sogenannte *Death*-Rezeptoren wie z.B. CD95. In diesem Fall verursacht die Bindung des dazugehörigen Liganden die Bildung eines den Zelltod induzierenden Signalkomplexes, der über Adaptermoleküle (z.B. FADD) zur Aktivierung der für den Zelltod wichtigen Caspasen führt (Krammer, 2000). Der andere, sogenannte mitochondriale Hauptweg wird hauptsächlich als Reaktion auf extra- oder intrazelluläre Ereignisse (z.B. oxidativer Stress oder Beschädigung der DNA) aktiviert (Rich, 2000; Ravagnan, 2002). Es kommt zu der Freisetzung einer Anzahl apoptotischer Faktoren (z.B. Cytochrom c) aus den Mitochondrien, was ebenfalls

die Aktivierung einer Reihe von Caspasen zur Folge hat. Offensichtlich muss es neben diesen beiden Wegen jedoch noch zusätzliche Möglichkeiten der Induktion von Apoptose geben. So wurde in letzter Zeit mehrfach in sich entwickelnden, postmitotischen neuronalen Populationen eine Form des Zelltods festgestellt, der unabhängig von der Aktivierung von Caspasen ist (Earnshaw, 1999; Wang, 2000; Oppenheim, 2001). Hierbei scheint AIF (*Apoptosis-inducing factor*), eine mitochondriale Oxidoreduktase, eine entscheidende Schlüsselposition einzunehmen (Cande, 2002; Cregan, 2002). Es wird die Aufgabe kommender Studien sein, weitere Details dieser Art des Zelltods zu beschreiben. Die Apoptose ist mit einer Reihe von morphologischen und biochemischen Charakteristika verbunden. Es kommt zu einer Aggregation des Chromatins und einer nukleären und zytoplasmatischen Kondensation. Anschließend erfolgt der Zerfall der Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen. Hierbei handelt es sich um membranumgrenzte Strukturen, die Ribosomen, morphologisch intakte Mitochondrien und Kernmaterial enthalten. Diese apoptotischen Körperchen verursachen keine inflammatorischen Prozesse und werden durch Makrophagen oder umliegende Epithelzellen phagozytiert. Ein auffälliges und für die Detektion von Apoptose wichtiges biochemisches Merkmal ist die Degradierung der DNA (Wyllie, 1980).

DNA-Degradierung während der Apoptose

Während der Apoptose wird die DNA in 50 – 200 kb große Fragmente zerteilt, die später internukleosomal gespalten werden. So entstehen Fragmente mit einer Länge von 180 – 200 Basenpaaren (ungefähre Größe eines Nukleosoms) und deren Vielfache. Die so entstandenen Fragmente dienen bei unterschiedlichen Methoden des Nachweises von Zelltod (z.B. TUNEL, LM-PCR) als apoptotische Marker (Gavrieli, 1992; Blaschke, 1996). Diese Spaltungsprozesse werden unter anderem von einer spezifischen DNase (CAD, *caspase-activated DNase*) hervorgerufen. CAD wird zusammen mit ICAD (*inhibitor of CAD*), das gleichzeitig auch als Chaperon wirkt, synthetisiert. Kommt es in einer Zelle zur Induktion der Apoptose, so erfolgt die Spaltung des CAD:ICAD Komplexes. Das hierdurch aktivierte CAD ist nun in der Lage chromosomale DNA zu degradieren. Die enzymatische Aktivierung dieses Prozesses erfolgt normalerweise durch Caspase 3 (Abb.6; Nagata, 2000).

Neuere Arbeiten beschreiben einen weiteren Caspase-unabhängigen Weg der DNA-Degradierung. Bei diesem über AIF (*apoptosis-inducing factor*) induzierten Weg wird die DNA durch EndoG, einer mitochondrien-spezifischen Endonuklease abgebaut (Li,

2000; Daugas, 2000; Wang, 2002). Dieser Abbau der chromosomalen DNA wird darüber hinaus durch Exonuklease und DNaseI unterstützt (Widlak, 2001). Um jedoch die genaue Bedeutung von EndoG in diesem Zusammenhang zu erforschen sind weitere Studien nötig. So wurde kürzlich gezeigt, dass die internukleosomale Spaltung bei CAD^{-/-} DT40 Zellen blockiert ist, wenngleich die hochmolekulare Fragmentierung der DNA stattfindet (Samejima, 2001).

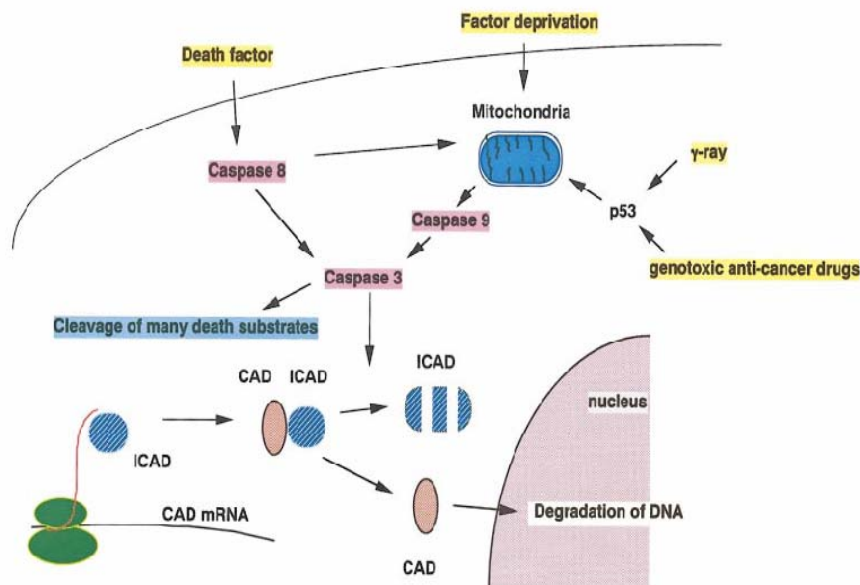


Abb.6: Apoptotische Degradierung der DNA

CAD wird durch Caspase 3 aktiviert und ist unter anderem verantwortlich für die Degradierung der DNA während der Apoptose.

(Nagata, 2000)

Caspasen: Exekutoren der Apoptose

Caspasen bilden eine Enzymfamilie von bisher 14 identifizierten Cystein-Proteasen (Nakaya, 1999). Caspasen (*cysteine aspartate-specific proteases*) spielen eine zentrale Rolle bei der Apoptose und sind über ein Cystein-Molekül in ihrem aktiven Zentrum und ihre Fähigkeit Substrate spezifisch nach Aspartat zu spalten, definiert (Hengartner, 2000). Ihre Synthese erfolgt als inaktives Proenzym, das aus einer N-terminalen Pro-Domäne, sowie einer großen und einer kleinen Untereinheit besteht (Abb.7).

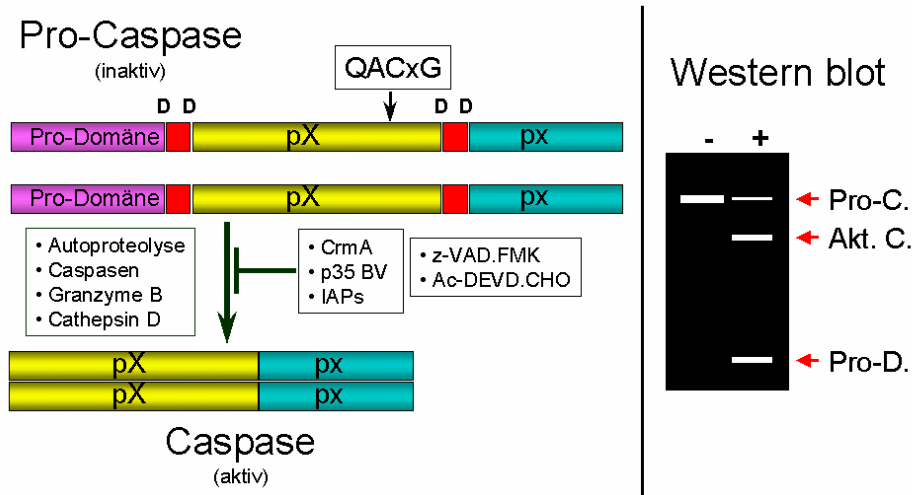


Abb.7: Aktivierungsschema für Caspasen

Die aktive Form der Caspase wird durch Spaltung einer inaktiven Pro-Caspase produziert. Diese Aktivierung kann sowohl autoproteolytisch, durch andere Caspasen, als auch durch eine Anzahl weiterer Proteine (z.B. Granzyme B) erfolgen. Eine Anzahl von Peptiden (z.B. Ac-DEVD-CHO oder BAF) bzw. Proteinen (z.B. Crm A oder IAPs) können diese Aktivierung inhibieren.

(bereitgestellt von F.-P. Wachs)

Die Aktivierung der Caspasen erfolgt durch Proteolyse an den spezifischen Aspartat-Schnittstellen, wodurch eine gegenseitige Katalyse bzw. Autokatalyse ermöglicht wird. Nach Aktivierung der sogenannten Initiator-Caspasen (z.B. Caspase 8 oder 9) kommt es über eine Caspasen-Kaskade zur Aktivierung der eigentlichen Effektor-Caspasen (z.B. Caspase 3). Dies führt schließlich zur Spaltung einer Vielzahl von nukleären und zytosolischen Proteinen, wie z.B. Lamin A und B, Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), G-Aktin, MEKK-1 und Gelsolin (Earnshaw, 1999).

Bcl-2 Proteinfamilie: Regulatoren der Apoptose

Neben den Caspasen kommt der Bcl-2 Proteinfamilie eine regulatorische Relevanz bei der Apoptose zu. Basierend auf Strukturähnlichkeiten und funktionellen Kriterien lässt sich die Bcl-2 Familie in drei Gruppen einteilen. Im Gegensatz zu Mitgliedern der Gruppe 1 (z.B. Bcl-2, Bcl-x_L), mit anti-apoptotischer Wirkung, fördern Proteine der Gruppe 2 (z.B. Bax, Bak) und der Gruppe 3 (z.B. Bik, Bid) den Zelltod. Unterschiede zwischen den beiden pro-apoptotischen Gruppen sind vor allem auf struktureller Ebene zu finden. Mitglieder der Gruppen 1 und 2 haben 2 - 4 konservierte Bcl-2 Homologie Domänen (BH1-4), wohingegen Proteine der Gruppe 3 nur die BH3 Domäne besitzen (Tsujimoto, 2000; Borner, 2003). Diese homologen Domänen ermöglichen den

Mitgliedern der Bcl-2 Familie die Homo- bzw. die Heterodimerisierung, wodurch pro- und anti-apoptotische Vertreter der Familie miteinander funktionell interagieren können (Adams, 1998). Dies kann zu einer gegenseitigen Neutralisierung führen. Eine wichtige Funktion der Mitglieder der Bcl-2 Familie stellt die Regulierung der Abgabe pro-apoptotischer Faktoren, wie z.B. Cytochrom c, aus den Mitochondrien ins Zytosol dar (Hengartner, 2000). Der Mechanismus hinter dieser Regulation ist bis dato nicht völlig aufgeklärt. Vieles spricht für eine Oligomerisierung von Bcl-2 Homologen und einer daraus resultierenden Porenbildung, die es Ionen und pro-apoptotischen Proteinen ermöglichen könnte, ins Zytoplasma zu gelangen (Muchmore, 1996; Reed, 1997). Die Freisetzung von Cytochrom c wiederum führt zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade und somit zu einer Degradierung der Zelle (Li, 1997, Gottlieb, 2000; Ravagnan, 2002).

4. Zielsetzung

Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit beruht auf der Annahme, dass im adulten Gehirn von Säugetieren täglich eine Überproduktion von Nervenzellen stattfindet. Im Rahmen der vorliegenden Studie soll diese Überproduktion nachgewiesen und quantifiziert werden. Darüber hinaus soll das Schicksal dieser Zellen untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurde weiterhin die Hypothese aufgestellt, dass in den Zonen adulter Neurogenese ein Eliminierungsprozess vorliegen muss, um schwerwiegende Folgen für den Organismus zu verhindern. Dieser Eliminierungsprozess soll identifiziert, lokalisiert und quantifiziert werden. Es soll außerdem eine qualitative Analyse durchgeführt werden, um die Identität der zu eliminierenden Zellen feststellen zu können. Nach einer ausreichenden Charakterisierung soll außerdem untersucht werden, welchen Einfluss man auf dieses potentielle Wechselspiel zwischen Proliferation und Zelltod haben kann. Dementsprechend soll der Einfluss einer exogenen Regulation des Zelltods untersucht werden. Dabei soll Versuchstieren ein apoptosehemmendes Substrat (Caspase-Inhibitor) intraventrikulär injiziert werden. Diesem soll die Untersuchung einer endogenen Modulation gegenübergestellt werden. Diese Analyse soll mittels transgener Tiere durchgeführt werden, die einen genetischen Defekt (Überexpression eines anti-apoptotischen Gens) in der Regulation der apoptotischen Kaskade aufweisen. Die auf diesem Wege gewonnenen Daten sollen dazu beitragen, die Regulation adulter Neurogenese besser verstehen zu lernen, um dieses körpereigene Regenerationspotential in der Zukunft therapeutisch nutzbar zu machen.

II. Material und Methoden

1. Material und Bezugsquellen

1.1. Chemikalien

NBT/BCIP	Roche, Mannheim
BrdU	Sigma, Taufkirchen
DAB	Sigma, Taufkirchen
DABCO	Sigma, Taufkirchen
Eserserum	Pan Biotech, Aidenbach
Propidiumjodid	Sigma, Taufkirchen
PVA	Sigma, Taufkirchen
ssDNA	Sigma, Taufkirchen
tRNA	Sigma, Taufkirchen

Alle weiteren Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

1.2. Enzyme

DNase I	Sigma, Taufkirchen
Ligase	Promega, Madison, USA
RNA Polymerasen	Promega, Madison, USA
RNasin Ribonuclease	Promega, Madison, USA

Alle weiteren Enzyme wurden von New England Biolabs, Frankfurt am Main bezogen.

1.3. Antikörper

ms α BrdU	1:400	Roche, Mannheim
ms α β -III-Tubulin	1:500	Promega, Madison, USA
ms α Nestin	1:1000	BD PharMingen, San Diego, USA
ms α NeuN	1:20	Salk Institute, San Diego, USA
rb α hu/ms Caspase 3 active	1:5000 (WB) bzw. 1:500 (IF)	R&D Systems, Minneapolis , USA
rb α GFAP	1:500	DAKO, Hamburg
rb α S100 β	1:2500	Swant, Bellizona, Schweiz
rt α BrdU	1:500	Harlan SERA-LAB, Loughborough, England
sh α DIG AP	1:500	Roche, Mannheim
sh α DIG FITC	1:100	Roche, Mannheim

Sämtliche Sekundärantikörper wurden von Dianova, Hamburg bezogen. Als Verdünnungen wurden 1:500 (Biotin) bzw. 1:1000 (Fluoreszenz) verwendet.

1.4. Tiere

Im tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurden hauptsächlich junge adulte Wistar Ratten bzw. C57BL/6 Mäuse aus der Zucht Charles River (Sulzfeld) verwendet.

Die transgenen Bcl-2 überexprimierenden Mäuse wurden freundlicherweise von Robert M. Friedlander (Cardiovascular Research Center, Harvard Medical School, Charleston, USA) zur Verfügung gestellt. Sie stammen aus der Zucht von JM Martinou (Glaxo Institute for Molecular Biology, Geneva, Switzerland). Es handelt sich hierbei um Tiere der Linie NSE 73 (Martinou, 1994), d.h. die Überexpression des humanen Bcl-2 Proteins erfolgt neuronal unter Kontrolle des NSE (*neuron-specific enolase*) Promotors. Die Expression in dieser Linie konnte sowohl embryonal (reduziert ab E 13), als auch im adulten Tier detektiert werden. Im adulten Tier ist eine hohe Bcl-2 Expression, neben einer Vielzahl weiterer Gehirnarealen sowohl im BO, als auch im GD nachgewiesen.

2. Puffer und Lösungen

2.1. Puffer und Medien

0,1 M Boratpuffer:	Borsäure		3,09 g
	H ₂ O _{dest}	ad	450 ml
	pH 8,5 mit 5 N NaOH einstellen		
0,2 M PO ₄ ³⁻ -Puffer:	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O		6,35g
	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O		41,35g
	H ₂ O _{dest}	ad	1000 ml
PBS:	0,2 M PO ₄ ³⁻ -Puffer		500 ml
	NaCl		9 g
	H ₂ O _{dest}	ad	1000 ml
10 x TBS:	Trizma HCl		132,2 g
	Trizma Base		19,4 g
	NaCl		90 g
	H ₂ O _{dest}	ad	1000 ml
20 x SSC:	NaCl		175,3 g
	NaCitrat x 2 H ₂ O		88,2 g
	H ₂ O _{dest}	ad	1000 ml
	pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen		
Substrat Puffer:	Tris-HCl pH 9,5		0,1 M
	NaCl		0,1 M
	MgCl ₂		50 mM
5 x TE:	Tris-HCl pH 8,0		50 mM
	EDTA		5 mM
10 x TBE:	Tris		500 mM
	Borsäure		500 mM
	EDTA		10 mM

5 x Auftragspuffer.	Saccharose	50 % (w/v)
	Harnstoff	4 M
	EDTA	50 mM
	Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
LB-Medium:	Bacto-Trypton	10 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Zur Herstellung von LB-Platten wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar zugesetzt. Zur Herstellung von Kanamycin⁺-Platten wurden dem abkühlenden Medium 25 µg/ml Kanamycin zugegeben.

2.2. Färbelösungen

DAB-Färbelösung:	TBS	40 ml
	H ₂ O ₂ (30 %)	12 µl
	NiCl ₂ -Lsg (8 %)	200 µl
	DAB tetrahydrochlorid (20 mg/ml)	500 µl
BCIP/NBT-Färbelösung:	NBT-Stammlsg.	450 µl
	BCIP-Stammlsg.	350 µl
	Substrat Puffer (siehe 2.1.)	100ml

NBT-Stammlsg.:

75 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium in 70 % Dimethylformamid/30 % H₂O₂

Lagerung: -20°C

BCIP-Stammlsg.:

50 mg/ml Bromo-chloro-indolyl-phosphat Toluidinsalz in Dimethylformamid

Lagerung: -20°C

2.3. Allgemeine histologische Lösungen

CPS:	Glycerin	250 ml
	Ethylenglycol	250 ml
	0,1 M PO_4^{3-} -Puffer	500 ml

PVA-DABCO:

12 g Glycerol und 4,8 g PVA wurden gut vermischt, mit 12 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ versetzt und ÜN gemischt. Nach Zugabe von 24 ml 0,2 M Tris pH 8 – 8,5 wurde unter gelegentlichen Schütteln für 30 min auf 50°C erhitzt. Danach erfolgte eine Zugabe von 2,5 % (w/v) DABCO (Triethylendiamin). Nach Durchmischung wurde 2 x 15 min mit 3000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen, aliquotiert und bei –20°C gelagert.

Prä-Hybridisierungs Mix:	Formamid	5 ml
	20 x SSC	2,5 ml
	20 x Denhardt	2,5 ml
	ssDNA	5 mg
	tRNA	5 mg
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ad	10 ml
20 x Denhardt:	Ficoll	0,4 %
	Polyvinylpyrrolidon	0,4 %
	BSA	0,4 %
	in 3 x SSC lösen	

4 % Paraformaldehyd:

4 g Paraformaldehyd werden in 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ nach Zugabe von 100 µl 10 N NaOH unter ständigen Rühren und Erwärmung auf 70°C gelöst. Hat sich das Paraformaldehyd vollständig gelöst, werden 50 ml 0,2 M PO_4^{3-} -Puffer zugegeben und durch einen Faltenfilter filtriert.

30% Saccharose:	Saccharose	150 g
	0,1 M PO_4^{3-} -Puffer	400 ml

Gelatine-Lösung:	Gelatine (300 Bloom)	3,5 g
	Chromkaliumsulfat	0,35 g
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	700 ml

3. Histologie

3.1. Histochemie

3.1.1. Nissl-Färbung

Die fixierten Gehirnschnitte wurden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Nach dem Antrocknen durchliefen die Objektträger eine absteigende Isopropanol-Reihe. Ausgehend von einer 1:1 Isopropanol/Chlorophorm-Mischung verweilten die Objektträger jeweils 2-3 min in 100 % (2 x), 96 % (2 x), 70 % und 50 % Isopropanol. Vor dem nun folgenden Färbeschritt wurden die Objektträger noch 2 x 3 min in H₂O_{dest} gewaschen. Die Färbung erfolgte mittels Inkubation in einer 1,5 %igen Kresylviolett-Lösung. Die Eintauchdauer war abhängig von der Schnittdicke und der Vorbehandlung des Gewebes.

Eine potentielle Überfärbung wurde mittels einer 70 % Isopropanol/0,5 % Acetat-Lösung korrigiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen in H₂O_{dest} erfolgte eine Nachdifferenzierung (10 min) in fließendem Leitungswasser. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Isopropanol-Reihe (30 %, 50 %, 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %) wieder entwässert, 3 x 3 min in *NeoClear* (Merck, Darmstadt) geklärt und mit dem Eindeckmittel *NeoMount* eingedeckelt.

3.1.2. DAPI-Färbung

Die fixierten Gehirnschnitte wurden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Die anschließende Inkubation in DAPI (15 min in 50 µg/ml; Roche, Mannheim) erfolgte bei RT und im Dunkeln. Danach wurden die Objektträger 3 x 10 min in TBS gewaschen und mit PVA-DABCO eingedeckelt. Das Waschen und die Lagerung erfolgten ebenfalls im Dunkeln.

3.2. Immunhistochemie

3.2.1. Immunfärbungen

Für Immunfärbungen wurden perfusionsfixierte, auf dem Schlittenmikrotom, gewonnene Gewebeschnitte verwendet. Die Färbung erfolgte unter ständigem Schütteln in Zellkulturschalen in Verbindung mit Netzeinsätzen (Costar, Corning, USA). Die Schnitte wurden 3 x 10 min in TBS gewaschen. Anschließend wurden sie 30 min in einer 0,6 % H_2O_2 /TBS-Lösung inkubiert (dies war bei Verwendung fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper nicht nötig). Nach einem erneuten Waschschrift (2 x 10 min in TBS) wurden die Schnitte 30 min in 3 % Eselserum/0,1 % Triton X-100/TBS blockiert. Der primäre Antikörper wurde in der gleichen Lösung aufgenommen, auf die Schnitte aufgetragen und ÜN bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (2 x 10 min) am nächsten Tag erfolgte eine erneute Inkubation in Blockierungslösung (3 % Eselserum/0,1 % Triton X 100/TBS) für 10 min. Anschließend wurde der in Blockierungslösung verdünnte Sekundärantikörper aufgetragen. Fluoreszenzfärbungen wurden erneut 3 x 10 min gewaschen, auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und mit PVA-DABCO eingedeckelt. Alternativ konnten biotinylierte Sekundärantikörper verwendet werden. Hierbei wurden nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS die Schnitte 60 min mit *Vectastain* (Vector, Burlingame, USA) inkubiert. Dabei kam es zu einer Konjugation der Sekundärantikörper mit Peroxidase. Diese Peroxidase katalysierte nach nochmaligen Waschen (2 x 10 min in TBS) die eigentliche Färbereaktion. Hierzu wurde 5-10 min in einer DAB-Färbelösung inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte 4 x 5 min in Leitungswasser inkubiert. Die Schnitte wurden in PO_4^{3-} -Puffer bei 4°C gelagert, bis sie auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen werden konnten. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Isopropanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 2 x 96 %, 2 x 100 %) entwässert, 3 x 3 min in *NeoClear* (Merck, Darmstadt) geklärt und mit *NeoMount* eingedeckelt.

3.2.2. α BrdU-Färbung

Um eine stereologische Quantifizierung durchführen zu können, wurden Serienschnitte der Gehirne angefertigt. Hiervon wurde jeder 6. Schnitt gefärbt und ausgewertet.

Für die Durchführung einer α BrdU-Färbung ist eine Vorbehandlung nötig, um die DNA zu denaturieren und so die Freilegung des darin eingebauten Antigens (BrdU) zu ermöglichen. Hierzu wurden die Schnitte 90 min in 50 % Formamid/2 x SSC auf 65°C erhitzt, dann 5 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC gewaschen, 30 min in 2 N HCl bei 37°C inkubiert und nochmals 10 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) gespült. Dieser wird durch mehrmaliges Waschen mit TBS (4 x 5 min) wieder entfernt. Als Primärantikörper wurden ms α BrdU in der Ratte bzw. rt α BrdU in der Maus verwendet.

3.2.3. TUNEL-Färbung

Die hier durchgeführte TUNEL-Färbung ist eine Modifikation des *ApopTag[®] Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit* (Intergen, Purchase, USA).

Für die Färbung wurden 14 μ m dicke Kryostatschnitte verwendet. Um eine stereologische Quantifizierung durchführen zu können, wurde jeder 10. Schnitt der in Serie geschnittenen Gehirns gefärbt. Zur Detektion der DIG-markierten apoptotischen Zellen wurde ein sh α DIG-FITC Antikörper (Roche, Mannheim) benutzt. Zur Gegenfärbung wurde Propidiumjodid (Stammlösung 1mg/ml wird 1:2500 in PBS verdünnt) verwendet. Hierzu wurden die Objektträger 5 min in Hellendahl-Gefäßen inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 4 x 5 min in PBS gewaschen und mit PVA-DABCO eingedeckelt.

Die Färbungen können auch auf perfusionsfixierten Gewebe (40 μ m; Schlittenmikrotom) durchgeführt werden. Hierzu wurde ein zu 3.2.4. TUNEL-Mehrfachmarkierungen identisches Protokoll verwendet. Anstatt der auf die Nachfixierung folgenden Immunfärbung wurden die Gewebeschnitte auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, mit Propidiumjodid gegengefärbt und eingedeckelt.

3.2.4. TUNEL-Mehrfachmarkierungen

Für die TUNEL-Mehrfachmarkierungen wurden perfusionsfixierte, mit dem Schlittenmikrotom gewonnene Gewebeschnitte benutzt. Die Färbung wurde unter ständigem Schütteln in Zellkulturschalen mit Netzeinsatz (Costar, Corning, USA) durchgeführt. Die Schnitte durchliefen nach mehrmaligen Waschen (3 x 10 min in PBS

und 1 x 2 min $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$) sowohl eine aufsteigende als auch eine absteigende Isopropanolreihe (50 %, 70 %, 90 % für je 2 min; 100 % EtOH für 10 min; 90 %, 70 %, 50 % EtOH für je 2 min). Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS erfolgte eine zweiminütige Äquilibration der Schnitte in TUNEL Verdünnungspuffer (Roche, Mannheim). Die TUNEL-spezifische Enzymreaktion erfolgte, ebenso wie die Äquilibration, in einem 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß bei 37°C. Es wurde ein Mix aus 15 % TdT, 35 % Reaktionspuffer und 50 % TUNEL Verdünnungspuffer verwendet. Die Enzymreaktion wurde nach 60 min mittels Stopp-Puffer beendet. Hierzu wurde 10 min schüttelnd bei RT inkubiert. Nach erneuten Waschen (3 x 10 min in PBS) folgte die Antikörperinkubation. Ab diesem Zeitpunkt fanden alle Arbeitsschritte im Dunkeln statt. Zuerst wurde 1 h bei RT mit sh α DIG FITC (Roche, Mannheim) inkubiert. Hierfür wurde der Antikörper 1:100 in Blockierungslösung inkubiert. Zur Verstärkung des Signals wurde nach erneutem Waschen (3 x 10 min in PBS) für 1 h in dk α sh IgG-FITC inkubiert. Nach dem Auswaschen des überschüssigen Antikörpers (3 x 10 min in PBS) wurde mit 4 % Paraformaldehyd nachfixiert.

Nun wurde erneut 3 x 10 min in PBS gewaschen und 1 h mit 3 % Eselserum/0,1 % Triton X-100/PBS blockiert. Die weiteren primären Antikörper wurden in der gleichen Lösung verdünnt und ÜN bei 4°C aufgetragen. Am nächsten Morgen wurde wieder 2 x 10 min in PBS gewaschen. Vor dem Auftragen des sekundären Antikörpers wurde nochmals 10 Minuten in 3 % Eselserum/0,1 % Triton X-100/PBS blockiert. Die Inkubation mit sekundären Antikörpern in 3 % Eselserum/0,1 % Triton X-100/PBS dauerte 60 min und wurde durch ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS beendet. Die Schnitte wurden nun auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Man ließ sie kurz antrocknen, bevor sie mit PVA-DABCO eingedeckelt wurden. Die Lagerung erfolgte in lichtdichten Objektträgerkästen.

3.3. *In situ* Hybridisierung

3.3.1. *In vitro* Transkription von Dig-markierter RNA

Für die Transkription fanden linearisierte Plasmide Verwendung, in welche vorher die gewünschten cDNA-Fragmente subkloniert wurden.

cDNA	Länge (bp)	Vektor	Enzym	Promotor
CPP 32	742	pCR-Script (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)	Eco R Sac I	T3 (as) T7 (s)
Nedd 2	339	pCR-Script (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)	Eco R Sac I	T3 (as) T7 (s)

Für die eigentliche Transkriptionsreaktion wurde ein Mix aus dem *Riboprobe*[®] Buffer System (Promega, Madison, USA), dem *DIG RNA Labeling Mix* (Roche, Mannheim) sowie RNA Polymerasen und *RNasin*[®] Ribonuklease Inhibitor der Fa. Promega (Madison, USA) verwendet:

Transcription Buffer [5x]	8 µl	Riboprobe [®] Buffer System; Promega (Madison, USA)
DTT [100 mM]	4 µl	Riboprobe [®] Buffer System; Promega (Madison, USA)
RNasin [20 U/µl]	2 µl	Promega (Madison, USA)
DIG RNA Labeling Mix [10x]	4 µl	Roche, Mannheim
DEPC H ₂ O	14 µl	Riboprobe [®] Buffer System; Promega
linearisiertes Plasmid [0,5 µg/µl]	4 µl	Siehe oben
RNA Polymerase [20 U/µl]	3 µl	Promega (Madison, USA)

Dieser Ansatz wurde gut gemischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Entfernung der DNA Matrize wurden dem Ansatz nun 2 µl RQ1 RNase-free DNase I [1 U/µl] zugesetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Um die DIG-markierten RNA-Sonden von den restlichen

freien Nukleotiden zu trennen, wurden Quick Spin Columns der Fa. Roche (Mannheim) verwendet. Die Konzentration der RNA-Sonden wurde photometrisch bestimmt und mit DEPC H₂O auf 100 ng/μl verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.3.2. Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde auf Kryostat-Schnitten durchgeführt. Diese wurden 5 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert, anschließend 2 x 5 min in PBS gewaschen und für 10 min in 0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) inkubiert. Die Inkubation in 0,1 M Triethanolamin wurde nochmals wiederholt. Diesmal jedoch nach Zugabe von 0,25 % Essigsäureanhydrid. Danach wurde erneut 2 x in PBS gewaschen. Nun wurde für 4 h bei 72°C in einer feuchten Kammer mit einem Prä-Hybridisierungs Mix inkubiert. Hierzu wurden 100 - 200 μl des Gemisches auf einen Objektträger aufgetragen und mit Parafilm gegen Verdunstung geschützt. Nach Ablauf der 4 h wurde der Prä-Hybridisierungs Mix vorsichtig abgezogen und durch den eigentlichen Hybridisierungs Mix ersetzt. Dieser ist von der Zusammensetzung identisch, enthält jedoch 0,2 – 2 ng/μl der DIG-markierten RNA Sonde. Diesmal wurden 100 μl pro Objektträger aufgetragen, mit Parafilm abgedeckt und ÜN bei 72°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde 2 x 5 min in 2 x SSC bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger 3 x 40 min in 50 % Formamid/5 x SSC bei 70°C inkubiert und nochmals 5 min in 2 x SSC bei RT gewaschen. Der nun folgende 15 min Blockierungsschritt erfolgte durch Zugabe eines Blockierungspuffers [2 % Blocking Reagent (Roche, Mannheim)/TBS/0,3 % Triton X-100)]. Diese Lösung wurde auch für die anschließende Antikörperinkubation verwendet. Dazu wurde der sh α Dig AP Antikörper (Roche, Mannheim) 1:500 verdünnt und für 2 – 3 h bei RT aufgetragen.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 2 x 10 min in TBS und 1 x 10 min in Substrat Puffer gewaschen. Zur Detektion wurden die Objektträger in NBT/BCIP-Entwicklungslösung gegeben und im Dunkeln inkubiert. Die Entwicklung des Signals kann von 1 bis zu 120 h dauern. Bei längeren Entwicklungszeiten sollte die Färbelösung alle 24 h gewechselt werden. Dazwischen sollte einmal mit Substrat Puffer gewaschen werden. Nach der Entwicklung des Signals wurde die Reaktion mit 5 x TE Puffer (pH 7,5) gestoppt und die Objektträger mit *Aquatex* (Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

4. Isolierung von Nukleinsäuren

4.1. Isolierung von DNA

Die Isolierung der DNA erfolgte mittels des *FastDNA[®]Kits* (BIO 101, Vista, USA). Der Aufschluss des Gewebes erfolgte in einem *FastPrep[®]Instrument* (BIO 101, Vista, USA). Hierzu wurde das Gewebe in die mitgelieferten Reaktionsgefäße gegeben, aus denen vorher die Granulärkörner entfernt wurden, so dass nur noch die integrierte ¼ Inch Kugel das Gewebe mechanisch zerkleinerte. Für die chemische Lyse wurde die mitgelieferte CLS-TC Lösung verwendet.

4.2. Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe von *TRI REAGENT[®]* (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers.

4.3. Analyse der Nukleinsäuren

4.3.1. Photometrisch

Nukleinsäure-Lösungen wurden 1:20 in sterilem Wasser verdünnt. In einer Mikroküvette (100 µl Volumen) wurde die optische Dichte (OD) gegen Wasser bei 260 nm und 280 nm photometrisch (Ultraspec 3000; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Die OD₂₆₀ ergibt direkt die Konzentration der DNA-Lösung in µg/µl. Bei einer OD₂₆₀ > 1 wurde die Lösung weiter verdünnt und der Verdünnungsfaktor im Anschluss eingerechnet. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ weist auf Proteinverunreinigungen hin.

4.3.2. Agarosegele

Die Qualität isolierter DNA-Proben wurde mittels 0,8 – 1,5 % Agarosegele überprüft. Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf 50°C mit 1/10000 Volumen Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und anschließend das Gel

gegossen. Die Proben wurden vor dem Lauf mit 1/5 Volumen 6 x Auftragspuffer versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 – 120 V in 1 x TBE. Im Anschluss wurden die Banden im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht. Bei der Überprüfung von RNA wurde nach dem gleichen Schema verfahren, mit dem Unterschied, dass RNase freies DEPC Wasser verwendet wurde.

5. PCR-Techniken

5.1. LM-PCR

Zur Visualisierung der bei der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente wurde, aufgrund des geringen prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen, eine äußerst sensible Detektionsmethode (LM-PCR; Abb. 8), verwendet. Die hier durchgeführte LM-PCR basiert auf dem *ApoAlert™ LM-PCR Ladder Assay Kit* (CLONTECH, Palo Alto, USA), das im Rahmen dieser Arbeit modifiziert wurde. Die Ligation erfolgte nach den Angaben des Kit-Herstellers, jedoch unter Verwendung einer T4 DNA Ligase (1,5 u/Ansatz; GIBCO Life Technologies, Rockville, USA). Die PCR erfolgte mit Hilfe des *CLONTECH Advantage®* cDNA Polymerase Mixes in einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research, Waltham, USA).

PCR-Programm:

	8 min	72°C	
26 Zyklen:	1 min	94°C	Denaturierung
	1 min	55°C	Annealing
	1 min	72°C	Synthese
optional	15 min	72°C	

Je 15 µl der entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 80 V für 90 min. Die Auftrennung wurde auf einem UV-Leuchtschirm kontrolliert und mit einer Gel Print 2000i Station (MWG Biotech; Ebersberg) ausgewertet und dokumentiert.

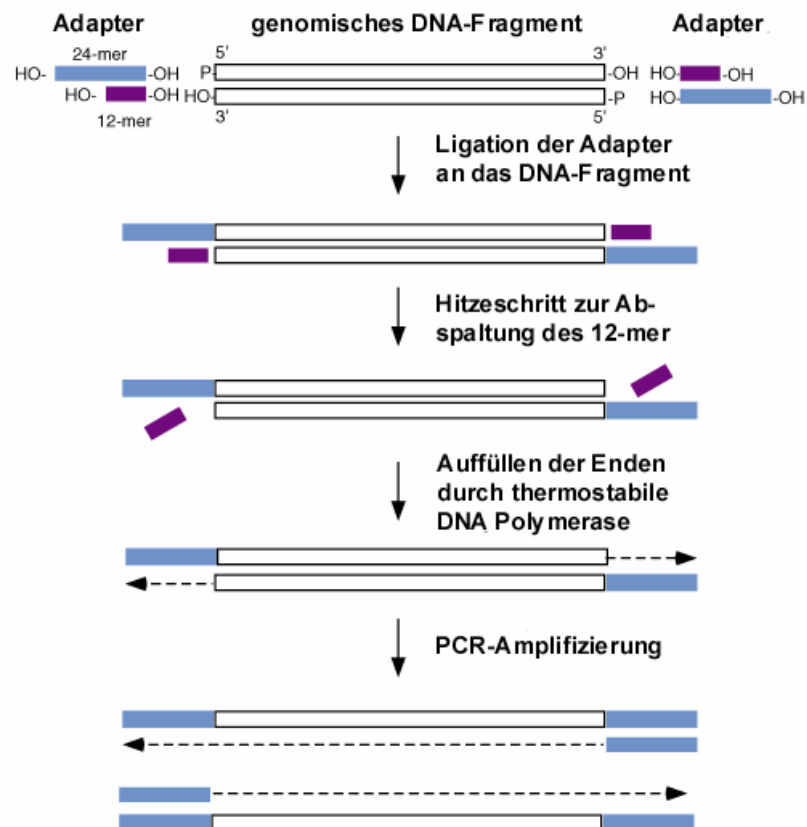


Abb.8: Grundprinzip der LM-PCR

Zur Visualisierung der während der Apoptose ablaufenden DNA-Degradierung werden an die entstandenen DNA-Fragmente sogenannte Adapter ligiert. Diese Adapter bilden bei der folgenden PCR die Ansatzstelle für die Primer. Auf diesem Wege ist eine äußerst sensitive Apoptosedetektion möglich.

5.2. RT-PCR

Die Detektion der Expression verschiedener Moleküle wurde mittels des *SUPERScript™ One-Step RT-PCR Systems* (GIBCO Life Technologies Rockville, USA) durchgeführt. Um etwaige Unterschiede in der Expression zu detektieren, wurde die Zahl der Amplifikationszyklen bzw. der eingesetzten DNA Menge während der PCR variiert.

Folgende Nukleotide wurden als Primer verwendet:

S = C oder G, R = A oder G, W = A oder C, K = G oder T, Y = T oder C

Caspase 2 (Nedd 2):

F-Primer: CAG AGC ATA GCC ACA TAT CAT GTC TGA GCG

R-Primer: GCA AGC ATA GCC ACA TAT CAT GTC TGA GCG

Caspase 3 (CPP32):

F-Primer: ATG GAA TAT ATC TGG ACA GCA GTT AC

R-Primer: GAG CAT KGA NAC AAT ACA YGG SAT CTG

Caspase 9:

F-Primer: GGA GGT GAA GRR CGA CCT GAC TGC

R-Primer: AGA TGT CAC TGG GKG TRG GCA AAC T

GADPH:

F-Primer: ATT GTC AGC AAT GCA TCC TGC A

R-Primer: AGA CAA CCT GGT CCT CAG TGT A

PCR-Programm:

	20 min	50°C	cDNA Synthese
30 Zyklen:	15 sek	94°C	Denaturierung
	30 sek	55°C	Annealing
	1 min	72°C	Synthese
optional	7 min	72°C	

Je 15 µl der entstandenen PCR-Produkte wurden auf ein 1,2 %iges Agarose-Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 80 V für 90 min. Die Auftrennung wurde auf einem UV-Leuchtschirm kontrolliert und mit einer Gel Print 2000i Station (MWG Biotech; Ebersberg) ausgewertet und dokumentiert.

6. Klonierung von DNA-Fragmenten

6.1. Gewinnung der DNA

Es wurden 45 µl des relevanten RT-PCR-Ansatzes auf ein 1,2 % Agarosegel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die DNA-Banden im UV-

Licht (254 nm) sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des *Agarose Gel DNA Extraction Kits* (Roche, Mannheim). Ein Teil der extrahierten DNA wurde erneut mittels eines Agarose-Gels auf ihre Qualität überprüft.

6.2. Klonierung und Plasmid-Isolierung

Die Transformation geschah mittels des *Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kits* (Invitrogen, Carlsbad, USA) unter Verwendung der mitgelieferten *TOP10 One Shot™* kompetenten Zellen (*E. coli*). Diese wurden auf LB-Agarplatten (Kanamycin⁺) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. 16 der am nächsten Tag sichtbaren Klone wurde gepickt und in 10 ml flüssigen LB-Medium (Kanamycin⁺) erneut ÜN inkubiert. Die Isolierung der Plasmide aus den Klonen erfolgte mit Hilfe des *QIAwell 8 Plasmid Kits* (Qiagen, Hilden). Abschließend wurden die Größe und die Qualität des Plasmids erneut elektrophoretisch überprüft.

6.3. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Fa. Sequiserve (Vaterstetten), wobei die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger, 1977) verwendet wurde.

7. Western Blotting

Aus den zu untersuchenden Geweben wurde Protein mittels *TRI® REAGENT* (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) gemäß Anleitung extrahiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Ausubel et al. (1999).

8. Gewebeaufarbeitung

8.1. Perfusionsfixierung

Vor Beginn der Perfusionsfixierung erhielten die Ratten eine „Überdosis“ Anästhetikum, d.h. ca. 2-3 ml des Anästhetikums (vgl. Kapitel II. 9.1.) wurden

intraperitoneal injiziert. Den tief narkotisierten Tieren wurde der Brustraum geöffnet, eine Perfusionsnadel in die linke Herzkammer eingeführt und bis zur Aorta vorgeschoben. Anschließend wird durch einen gezielten Schnitt die rechte Vorkammer des Herzens geöffnet, um ein Abfließen des venösen Blutes zu ermöglichen. Gleichzeitig wurde begonnen, mittels einer Midi-Vario MS/CA 4-6 Peristaltikpumpe (Ismatec, Wertheim-Mondfeld) eisgekühlte 0,9 %ige NaCl-Lösung über die Perfusionsnadel in das Tier zu pumpen. Anschließend wurde auf eisgekühltes 4 %iges Paraformaldehyd umgeschaltet. Nach einigen Minuten wurden die Tiere dekapitiert und die Gehirne konnten entnommen werden.

8.2. Gehirnentnahme

Perfusionsfixierte Gehirne wurden sofort nach der Entnahme nachfixiert. Hierzu wurden sie in 4 % Paraformaldehyd-Lösung eingelegt und bei 4°C leicht geschüttelt. Die Nachfixierung war mit dem Absinken des Gehirns auf den Gefäßboden beendet (ca. 24-30 h). Anschließend wurden die Gehirne in 30%iger Saccharose-Lösung bei 4°C gelagert.

Gehirne, die vor der Entnahme nicht perfusionsfixiert wurden, mussten, um die Struktur möglichst zu erhalten, umgehend eingefroren werden. Dabei kam pulverisiertes Trockeneis zur Anwendung. Im Anschluss wurden die Gehirne bei -80°C gelagert.

8.3. Herstellung von Gewebeschnitten

8.3.1. Gelatine-Beschichtung von Objektträgern

Die Objektträger wurden vor dem Beschichten 10 min in Chromschwefelsäure gereinigt. Anschließend wurden sie für 30 - 60 min in Leitungswasser vorgespült und 10 min in deionisiertem Wasser nachgespült. Die gereinigten Objektträger wurden 1 min in frisch filtrierte Gelatinelösung gestellt und ÜN bei 37°C getrocknet. Der Beschichtungsvorgang wurde am nächsten Tag nochmals wiederholt.

8.3.2. Schneiden am Schlittenmikrotom

Das Schneiden der perfusionsfixierten Gehirne erfolgte mittels eines modifizierten SM 2000 R Schlittenmikrotoms (Leica, Bensheim). Der ursprüngliche für Paraffinschnitte vorgesehene Kopf des Mikrotoms wurde durch einen Kupferkopf ersetzt, der das Auffrieren der zu schneidenden Gehirne ermöglichte. Dieser wurde mit Trockeneis und Ethanol vorgekühlt. Anschließend wurde ein Einbettmedium (Tissue Tek; Sakura, Torrance, USA) aufgebracht. Hierauf wurde das Gehirn mit einem Tropfen PO_4^{3-} -Puffer aufgefroren und mit pulverisierten Trockeneis überhäuft. Nach kompletter Durchfrierung des Gehirns wurde mit dem Schneiden begonnen. Die Schnittdicke betrug 25 μm bei Mäuse- und 40 μm bei Rattengehirnen. Die Schnitte wurden in mit Gefrierschutzlösung (CPS) befüllten 96-Well Platten (Costar, Corning, USA) bei -20°C gelagert.

8.3.3. Schneiden am Kryostat

Unfixierte Gehirne wurden mittels eines CM 3000 Kryostaten (Leica, Bensheim) geschnitten. Die Gehirne wurden mit Einbettmedium (Tissue Tek; Sakura, Torrance, USA) auf den Objekthalter aufgefroren und auf eine Dicke von 14 μm geschnitten (Objekttemperatur: -17°C ; Kammertemperatur: -18°C).

Die Schnitte wurden direkt auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost[®] Plus; Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht. Nach dem Antrocknen der Schnitte auf den Objektträger bei RT wurden diese bei -80°C gelagert.

9. *In vivo* Experimente zur Modulation der Apoptose neuronaler Stamm- und Vorläuferzellen

9.1. Injektion eines Caspase-Inhibitors in den Seitenventrikel

Für dieses Experiment wurden männliche Wistar-Ratten verwendet ($n = 40$; Charles River; Sulzfeld). Zu Beginn des Experiments waren die Tiere ca. 3 Monate alt und ihr Gewicht betrug $275 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$. Die Tiere wurden in 4 Versuchsgruppen eingeteilt. Es gab jeweils 2 frühe Gruppen und 2 späte Gruppen (jeweils eine Gruppe die den Caspase-Inhibitor erhielt und eine Kontrollgruppe).



Abb.9: Versuchsablauf des Caspase-Inhibitor Experiments

Für die Anästhesie wurde ein Mix aus Ketamin (24,8 mg/ml; 10% Ketamin, WDT, Garbsen), Acepromazinmaleat (0,248 mg/ml; Vetranquil®, SANOFI-CEVA GmbH; Düsseldorf) und Xylazinhydrochlorid (1,26 mg/ml; Rompun®, Bayer, Leverkusen) verwendet. Dieser wurde mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung angesetzt. 1,4 ml dieses Mixes wurde den Ratten in 2 Stufen injiziert (Stufe 1 intraperitoneal, nach Einsetzen der Wirkung wurde die 2. Hälfte intramuskulär injiziert). Die Augen der Versuchstiere wurden mittels Augensalbe (Bepanthen; Roche, Grenzach-Wyhlen) vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurden die Tiere in einen Stereotaxierahmen (David Kopf, Tujunga, USA) fixiert (Abb.11). Mit einem Skalpell wurde ein ca. 3 cm langer Schnitt an der Schädeloberseite durchgeführt. So wurde der Schädel freigelegt, mittels 70 % EtOH und 3 % H₂O₂ desinfiziert und getrocknet. Der Schädel wurde nun in die „flat skull“ Position gebracht, d.h. Bregma und Lambda wurden in eine gemeinsame Ebene gebracht. Nach dem Eindrehen zweier Fixierschrauben wurde die vorher gassterilisierte Führungskanüle implantiert (Abb. 10; Koordinaten: anteroposterior +8,5 und lateral – 1,5).

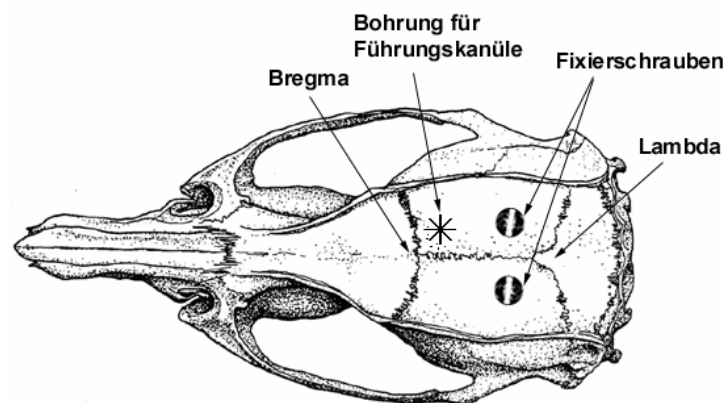


Abb. 10: Schädelknochen einer adulten Ratte

Es wurde ein 3-teiliges Kanülenset (Plastics One, Roanoke, USA) verwendet (Abb. 11):

1. Führungskanüle (24GA; 4,5 mm Kanülenlänge)
2. Dummy-Kanüle (passend für 4,5 mm/+ 0,0 mm)
3. Injektionskanüle (31GA; passend für 4,5 mm/+ 0,5 mm)

Die Kanülen wurden mittels des kaltpolymerisierenden Kunststoffes *Denta-Fast* (M+W Dental, Bidingen) fixiert.

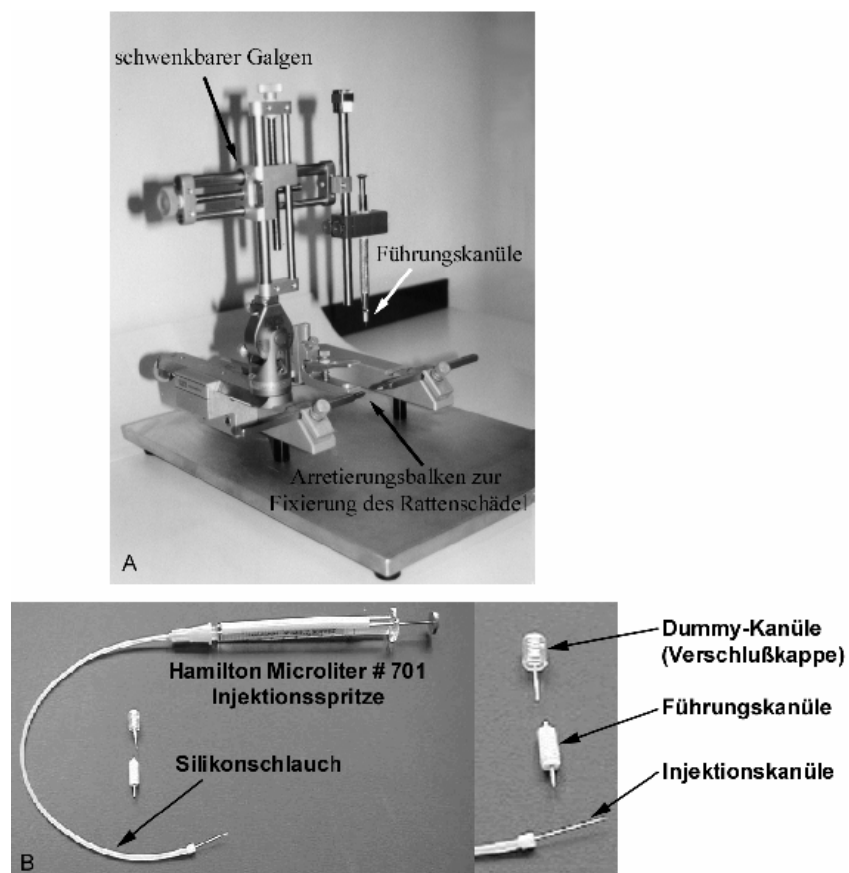


Abb.11: Operative Vorrichtungen zur intraventrikulären Injektion

(A) Stereotaxierrahmen zur Durchführung stereotaktischer Operationen an Ratten

(B) Injektionssystem zur Applikation des Caspase-Inhibitors

In der zweiwöchigen postoperativen Erholungsphase wurden täglich Gewichtskontrollen durchgeführt. Die anschließenden Injektionen erfolgten mittels einer Hamilton (Bonaduz, Schweiz) Microliter #701 Spritze. Diese wurde mit Hilfe einer Kanüle (Microlance, 0,7 mm x 30 mm, Spitze gekürzt; Becton Dickinson, Heidelberg) und einem Silikonschlauch (CLR/CT24SR, Plastics One, ca. 10 cm) mit

der Injektionskanüle verbunden. Um einen zu großen Verlust an Inhibitor zu vermeiden, wurde die Spritze mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ (steril) befüllt und eine Luftblase zwischen dem H_2O und dem Inhibitor belassen. Für die Injektion wurden die Tiere mittels Isofluran, unter Verwendung eines Trajan 808 Systems (Dräger, Lübeck) narkotisiert. Es wurden 7,6 μl einer DMSO-Lösung (1:20 in PBS) bei den Kontrollgruppen oder 7,6 μl einer 5 mM Inhibitor-Lösung (Boc-Aspartyl[Ome]-Fluoromethylketon = B-D-FMK = BAF; 3 mg Inhibitor in 114 μl DMSO gelöst und 1:20 in PBS verdünnt; Enzyme Systems Products, Livermore, USA) injiziert. Parallel zu den intraventrikulären Injektionen erhielten die Ratten BrdU in den Bauchraum injiziert (50 mg/kg; Stammlösung 20 mg/ml in 0,9 % steriler Kochsalzlösung). Einen Tag nach den letzten Injektionen wurden die Gehirne der beiden frühen Gruppen perfusionsfixiert und entnommen. Die beiden späten Gruppen folgten nach weiteren 4 Wochen.

9.2. Analyse transgener Mäuse (Apoptose-Protektion durch Bcl-2 Überexpression)

Zur Untersuchung endogener Einflussnahme auf die Apoptose im System der adulten Neurogenese wurden transgene Mäuse analysiert, in denen die Expression von Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein, stark erhöht war (vgl. II.1.4.). Es wurden ca. 8 Wochen alte, männliche Tiere verwendet. Um ein eventuell erhöhtes Proliferationsverhalten aufzeigen zu können, wurde 7 Tieren eine einmalige Dosis BrdU (10 mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung) von 50 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Zum gleichen Zeitpunkt erhielten 7 Kontrolltiere (C57BL/6) die gleiche Menge BrdU. 24 h später wurden diese perfundiert und für die weitere histologische Auswertung verarbeitet.

Um ein potentiell erhöhtes Überleben neugeborener Zellen nachweisen zu können, wurden 2 weitere Gruppe (4 Bcl-2 transgene Tiere und 4 Kontrolltiere) 4 Wochen nach der einmaligen BrdU-Injektion perfundiert und aufgearbeitet.

10. Auswertung

10.1. Mikroskopie

Die lichtmikroskopischen Analysen (insbesondere die Quantifizierungen) erfolgten mittels eines DM RBE Mikroskops (Leica, Bensheim) unter Verwendung eines 10 x PL APO bzw. 40 x PL APO Öl-Objektives (numerische Aperatur 1,25).

Die Auswertung und Bildgebung fluoreszenzmehrfachmarkierter Gehirnschnitte erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskopsystem (TCS-NT; Leica, Bensheim) unter Verwendung eines 40 x PL APO Öl-Objektivs (1,25 numerische Aperatur). Die erzeugten Bilder wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop (Adobe, San Jose, USA) weiter verarbeitet.

10.2. Definition der Auswertungsareale

10.2.1. Inhibitor-injizierte Ratten

Die perfundierten Gehirne wurden zur genaueren Analyse in 3 Teile geteilt (Übersicht siehe Abb.1). Der vordere Teil (BO mit Teil des rostralen Gehirns) wurde sagittal geschnitten. Der Mittelteil (mit GD und SVZ) wurde frontal geschnitten. So konnten die einzelnen Areale besser analysiert werden. Die Schnittdicke betrug in beiden Fällen 40 µm. Es wurde jeder 6. Schnitt ausgewertet. BO und SVZ wurden vollständig ausgezählt, wohingegen die Auswertung des GD durch 2 sogenannte Landmarken limitiert war (Interaural 6,20 mm – 2,96 mm; Paxinos, 1998). Hierbei wurde die Subgranulärschicht als eine 2 Zellschichten dicke Schicht zwischen GCL und Hilus definiert und der GCL zugerechnet.

10.2.2. Bcl-2 transgene Mäuse

Analysiert wurden sagittale Gehirnschnitte mit einer Schnittdicke von 25µm. Durch die Verwendung jedes 6. Schnittes wurden ca. 11 Schnitte je Tier (entspricht ca. 1,6 mm medio-lateraler Richtung) ausgewertet. Das analysierte Areal war durch 2 räumliche Begrenzungen definiert: vom Trennpunkt zwischen dorsalem und ventralem GD und dem mitsagittalem Schnitt. Zellen wurden in der ganzen GCL analysiert. Hierbei wurde

die Subgranulärschicht als eine 2 Zellschichten dicke Schicht zwischen GCL und Hilus definiert und der GCL zugerechnet.

Die Analyse der SVZ und des BO wurden nicht durch sogenannte Landmarken beschränkt, sondern konnte vollständig erfolgen, d.h. es konnte jeder 6. Schnitt dieser Strukturen ausgewertet werden.

10.3. Quantifizierung

Zur Quantifizierung wurde das Bild mit Hilfe einer gekühlten CCD Videokamera auf einen Computer übertragen und mittels „Stereo Investigator“, einem Analyse-Programm (MicroBrightField, Colchester, USA), ausgewertet. Dieses Programm ermöglicht, unter Verwendung der „Optical Dissector“ Methode (Williams, 1988), die Volumen- und Zelldichtebestimmung von Gehirnstrukturen. Aus diesen Werten ließen sich später die Gesamtzellzahlen errechnen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA Varianzanalyse mit anschließendem Fisher PLSD Test bzw. zweiseitigen T-Tests. Signifikante Unterschiede wurden als p-Werte ausgedrückt.

10.4. Qualitative Auswertung

Zur Bestimmung des neuronalen Anteils bei den neuen ausdifferenzierten Zellen wurde eine Serie von jedem 6. Schnitt analysiert. Diese wurden einer Doppelimmunfärbung mit Antikörpern gegen BrdU und dem neuronalen Marker NeuN unterzogen. Bei jedem Gehirn wurden in der GCL 100 BrdU-positive Zellen zufällig ausgewählt und nach einer gleichzeitigen Markierung mit NeuN untersucht. Um eventuell aufgrund von Überlappungen falschpositive Zellen zu vermeiden, wurden alle BrdU-positiven Zellen über ihre gesamte Z-Achse analysiert.

Die Analyse erfolgte mittels des konfokalen Lasermikroskop-Systems TCS-NT (Leica Microsystems, Bensheim). Der erhaltene Prozentsatz an NeuN-positiven Zellen wurde anhand der stereologisch ermittelten Anzahl an BrdU-positiven Zellen hochgerechnet, um die Anzahl an neuen Nervenzellen zu ermitteln.

III. Ergebnisse

1. Quantifizierung von Zellproliferation in Bulbus olfactorius und Gyrus dentatus adulter Ratten

Zur stereologischen Quantifizierung der Zellproliferation wurden 7 Wochen alte, weibliche Wistar Ratten ($n = 6$; Charles River, Sulzfeld) verwendet. Diese erhielten über einen Zeitraum von 4 Tagen tägliche Injektionen von BrdU (50mg/kg Körpergewicht) in den Bauchraum. BrdU ist ein Thymidinanalog und wird bei der Replikation während des Zellzyklus in die DNA eingebaut. Dies hat zur Folge, dass beide Tochterzellen markiert werden. 4 Wochen nach der letzten Injektion wurden die Tiere perfundiert und die Gehirne entnommen. Zur Analyse wurden am Schlittenmikrotom Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 40 μm angefertigt. Von diesen Schnitten wurde jeder 6. einer α -BrdU Immunfärbung unterzogen. Die Auszählung der BrdU positiven Zellen erfolgte mit Hilfe des computergestützten Stereologiesystems „Stereo Investigator™“ (MicroBrightField, Inc., Colchester, USA). Die Gesamtzahl an BrdU-positiven Zellen wurde durch eine stereologische Zählmethode („Optical Dissector“) ermittelt und repräsentiert die Zellzahl an neugeborenen Zellen in der untersuchten Struktur einer Hemisphäre des adulten Gehirns. Das Computerprogramm ermöglicht die Feststellung des Volumens der zu untersuchenden Struktur und der Dichte der BrdU-positiven Zellen. Diese Daten erlauben die Errechnung der Gesamtzahl an markierten Zellen in der untersuchten Struktur. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte diese Quantifizierung sowohl für die GCL des GD als auch für den BO. Die SVZ und der RMS wurden in dieser Untersuchung nicht quantifiziert, da sie zu diesem Zeitpunkt (4 Wochen nach der letzten Injektion) keine positiven Zellen mehr aufweisen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die in der SVZ markierten Zellen diese innerhalb der folgenden 1 - 2 Wochen verlassen und in den BO einwandern.

Die Zählung ergab eine Gesamtzahl (Mittelwert \pm SEM) von 69432 ± 12200 BrdU-positiven Zellen im BO. Von diesen waren 59159 ± 9946 Zellen in der GCL und 4503 ± 1313 in der GL lokalisiert. Des Weiteren wurde für die GCL des GD eine Gesamtzahl von 1960 ± 310 BrdU-positiven Zellen errechnet. Daraus und durch die ebenfalls

bestimmten Volumina der einzelnen Strukturen wurde die Dichte an BrdU-positiven Zellen in den untersuchten Gehirnregionen bestimmt (Tab.1).

	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen (Mittelwert \pm SEM)	BrdU-positive Zellen/mm ³
Bulbus olfactorius		
gesamt	69432 \pm 12200	3120
GCL	59159 \pm 9946	6765
GL	4503 \pm 1313	1146
Gyrus dentatus (GCL)	1960 \pm 310	4122

Tab. 1: Übersicht über Anzahl und Dichte BrdU-positiver Zellen in neurogenen Regionen im adulten Rattengehirn

2. Nachweis von Apoptose im adulten Rattengehirn

2.1. DNA-Leiter (LM-PCR)

Um einen qualitativen Apoptosenachweis in verschiedenen Arealen des Gehirns durchzuführen, wurde die Visualisierung einer DNA-Leiter gewählt. Hierbei wird die internukleosomal gespaltene DNA apoptotischer Zellen auf einem Agarosegel dargestellt. Auf dem Gel werden Banden der Größe 180 – 200 bp (ungefähre Größe eines Nukleosoms) und deren Vielfache sichtbar. Da es sich bei einem Gehirn um ein Organ mit sehr niedriger natürlicher Apoptoserate handelt, wurde das sehr sensible System der LM-PCR verwendet. Dazu wurde DNA aus verschiedenen Regionen des adulten Rattengehirns isoliert und untersucht. Neben Thymus-DNA als Positiv-Kontrolle wurde DNA aus dem Cerebellum, dem Cortex, dem BO, der SVZ und dem RMS verwendet. Da sich die Entnahme kleiner Strukturen wie SVZ und RMS, selbst unter Zuhilfenahme eines Dissektionsmikroskops, als sehr schwierig erwies, wurden diese teilweise mitsamt des umliegenden Gewebes entfernt. Dies bedeutet, dass damit zu rechnen ist, dass DNA aus dem Striatum bzw. dem olfaktorischen Trakt mit in die Analyse einbezogen wurden.

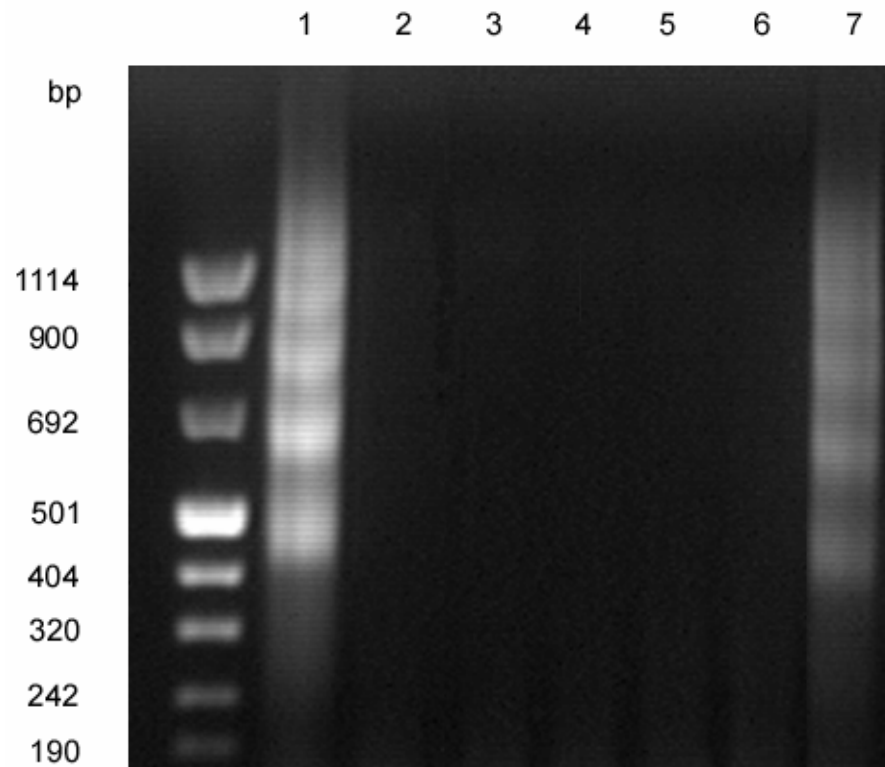


Abb. 12: DNA-Leiter nach LM-PCR

DNA aus dem BO zeigt nach der LM-PCR eine deutliche, mit der Positiv-Kontrolle (Thymus) vergleichbare, DNA-Leiter. (1 = Thymus; 2 = Cortex; 3 = Cerebellum; 4 = Hippocampus; 5 = SVZ/Striatum; 6 = RMS/olfaktorischer Trakt; 7 = BO).

Nach Durchführung der LM-PCR und des Gellaufs waren auf dem Gel deutlich 2 DNA-Leitern sichtbar. Es handelte sich um die DNA-Proben des Thymus (Positiv-Kontrolle) und des BO. Die Banden zeigten eine Größe von ca. 455, 670, 885, 1100 bp. Damit sind die DNA-Banden etwas größer als erwartet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die bei der LM-PCR ligierten Adapter mit amplifiziert wurden und somit die Gesamtzahl an Basenpaaren des PCR-Produkts erhöhen. Die Gewebeproben aus Cerebellum, Cortex, SVZ/Striatum, RMS/olfaktorischer Trakt zeigten keinerlei Spuren einer DNA-Degradierung.

2.2. TUNEL

Um eine genaue anatomische und zytologische Zuordnung des Zelltodes im adulten Gehirn durchzuführen, war die Verwendung einer histologischen Methode notwendig.

Hierzu wurde eine TUNEL-Färbung auf 14 µm dicken Kryostatschnitten durchgeführt. Die analysierten Gehirne stammten aus 3 Monate alten weiblichen Wistar Ratten. Die durchgeführte Färbung wies deutlich eine stark erhöhte Anzahl an TUNEL-positiven Zellen im BO und im RMS auf. Auch andere in die Neurogenese integrierte Strukturen wie z.B. SVZ und GD zeigten erhöhten Zelltod.

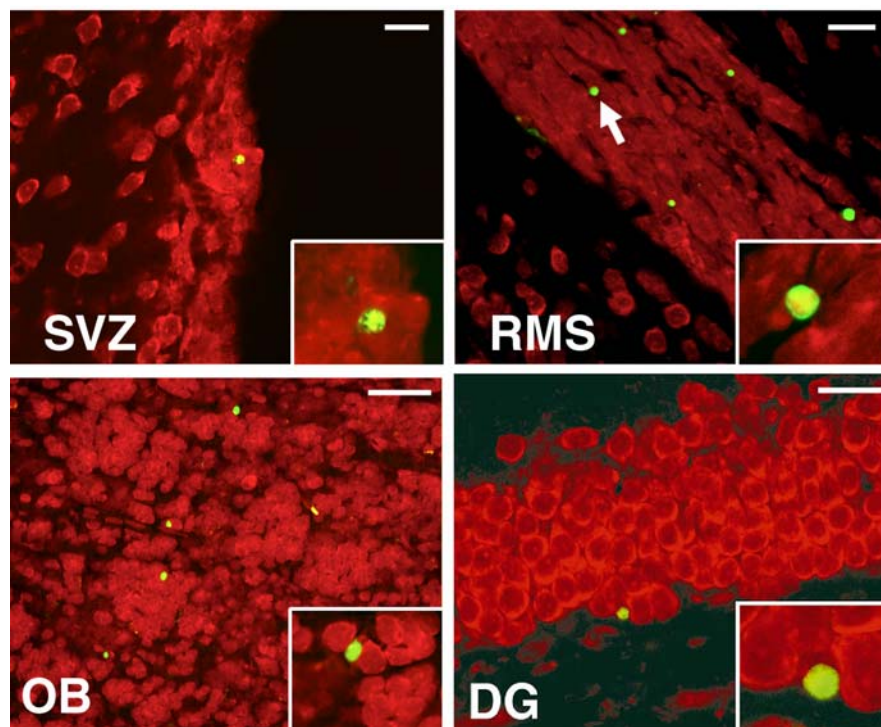


Abb. 13: TUNEL-positive Zellen in Zonen der Neurogenese

(grün = TUNEL; rot = Propidiumjodid-Gegenfärbung; Balken: SVZ, RMS, DG: 20 µm, OB: 50 µm; Biebl, 2000, modifiziert)

Auffällig war ebenfalls die Lokalisierung der TUNEL-positiven Zellen im GD. Sie waren fast ausschließlich an der Grenzschicht zwischen Hilus und GCL zu finden. Dies ist die Region in der auch die Zellneubildung stattfindet. Andere Bereiche des Gehirns (z.B. Cortex oder Cerebellum) waren nahezu frei von TUNEL-positiven Zellen.

3. Quantifizierung von Apoptose im adulten Rattengehirn und deren Verteilung

3.1. Quantifizierung von Apoptose im adulten Rattengehirn

Die Quantifizierung der Apoptoserate im adulten Rattengehirn erfolgte mittels einer TUNEL-Färbung. Die Gehirne stammten aus adulten 8 Wochen alten weiblichen Wistar Ratten ($n = 5$; Charles River, Sulzfeld). Es wurden 14 μm dicke Serienschnitte am Kryostat hergestellt. Jeder 10. Schnitt wurde einer TUNEL-Färbung unterzogen und am Mikroskop ausgewertet. Die stereologische Auswertung geschah analog zu der Quantifizierung der Zellproliferation. Im Unterschied hierzu wurde jedoch auf die Verwendung des „Optical Dissectors“ verzichtet und die Gesamtzahl an TUNEL-positiven Zellen direkt gezählt. Dies hatte eine vollständige, umfassende Zählung zur Folge und erforderte keine stereologische Berechnung. Es wurden folgende Strukturen analysiert: SVZ, RMS, BO (GCL, GL) und GD (GCL). Zusätzlich wurde die GCL des Cerebellums untersucht. Sie diente als Vergleich, da sie als einzige der untersuchten Strukturen keine endogene Neurogenese aufweist. Die Auswertung ergab folgende Werte:

	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen (Mittelwert \pm SEM)	TUNEL-positive Zellen/ mm^3
SVZ	204 \pm 42	481
RMS	450 \pm 44	1662
DG (GCL)	52 \pm 5	44
OB (GCL)	2440 \pm 378	218
OB (GL)	1074 \pm 86	121
Cerebellum (GCL)	254 \pm 26	2

Tab. 2: Anzahl und Dichte TUNEL-positiver Zellen in Zonen der Neurogenese bzw. in der GCL des Cerebellums

3.2. Verteilung apoptotischer Zellen im adulten Rattengehirn

Aus den bei der Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen gewonnenen Werten lässt sich die Verteilung der apoptotischen Zellen in neurogenen Zonen herleiten. So ist ein caudal-rostraler Gradient im System SVZ/RMS/BO festzustellen (vgl. Abb. 14). Wie

aus Tab. 3 ersichtlich ist, ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen in der SVZ sehr gering. Im Gegensatz dazu steht die Zelltodrate im BO, in dem nahezu 85 % der apoptotischen Zellen zu finden sind.

Struktur	Anteil [%]
SVZ	4,72 %
RMS	10,41 %
BO	84,88 %

Unterverteilung im BO	Anteil [%]
GCL	66,49 %
GL	29,26 %
EPL	4,25 %

Tab. 3: Prozentuale Verteilung TUNEL-positiver Zellen auf die ausgewerteten Strukturen

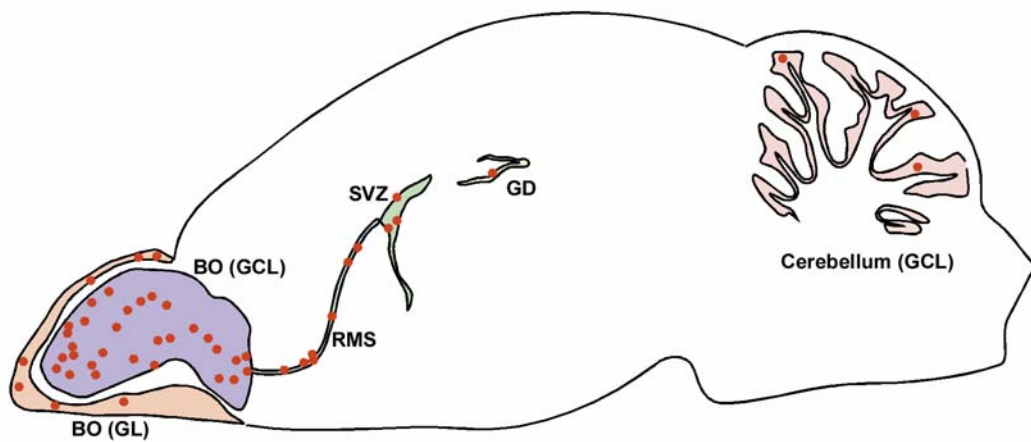


Abb. 14: Verteilung TUNEL-positiver Zellen

Schematische Zeichnung eines repräsentativen Sagittalschnittes eines adulten Rattengehirns zur Veranschaulichung der Verteilung TUNEL-positiver Zellen. Jeder rote Punkt repräsentiert 3 TUNEL-positive Zellen.

4. Nachweis von Caspasen im System SVZ/RMS/BO im Gehirn adulter Ratten

4.1. RT-PCR

Um erste Hinweise auf eine mögliche erhöhte Expression an mRNA verschiedener Caspasen in Regionen adulter Neurogenese zu erhalten, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurde mRNA aus dem BO, der Zone mit der höchsten Zelltodrate, mit mRNA aus dem Cortex adulter Ratten verglichen, der eine geringe Anzahl an apoptotischen Zellen aufweist. Es wurden Primer für Caspase 3 (CPP32), Caspase 2 (Nedd 2, ICH-1) und Caspase 9 verwendet. Als Kontrollprimer wurde GAPDH benutzt (Abb. 15).

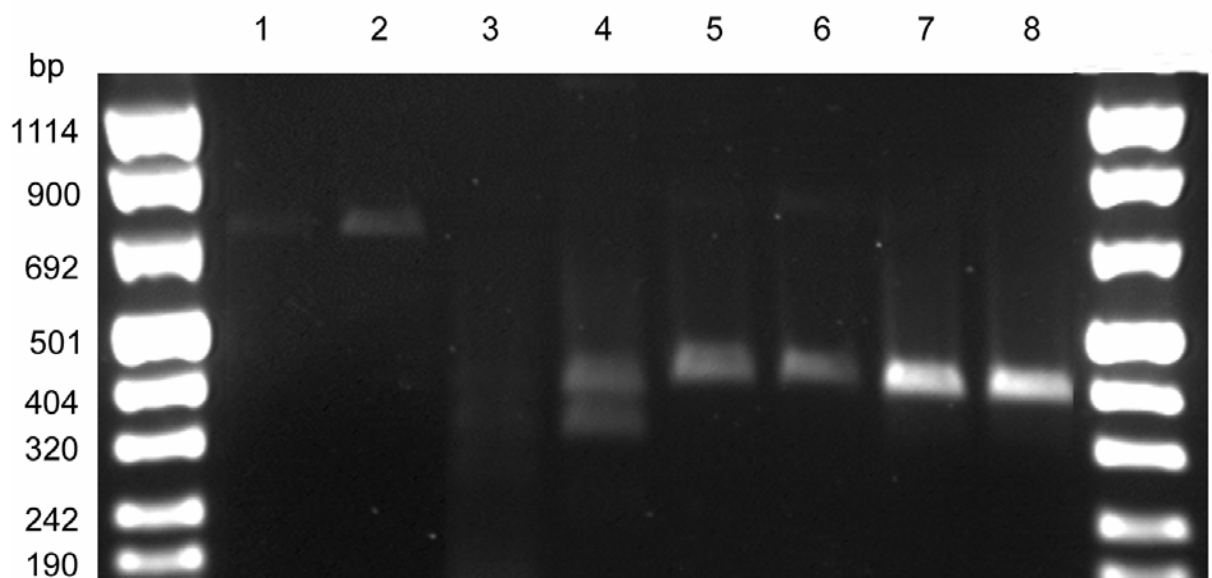


Abb. 15: RT-PCR mit mRNA aus unterschiedlichen Regionen des adulten Rattengehirns

Im BO können deutlich höhere Mengen an mRNA für Caspase 2 und 3 als im Cortex detektiert werden. Caspase 9 zeigt eine deutliche Expression in beiden Gewebeproben (1 = CPP32 Cortex; 2 = CPP32 BO; 3 = Nedd2 Cortex; 4 = Nedd2 BO; 5 = Caspase 9 Cortex; 6 = Caspase 9 BO; 7 = GAPDH Cortex; 8 = GAPDH BO).

Eine Auswertung der sichtbar gemachten Banden zeigte eine deutlich höhere Expression an Caspase 3 (800 bp) im BO verglichen mit der Expression im Cortex adulter Ratten. Ebenso konnte im BO eine höhere Expression an Caspase 2 (350 bp) erkannt werden. Sowohl Caspase 9 (480 bp) als auch die Kontrolle GAPDH (410 bp)

zeigten keinen Unterschied in der Höhe ihrer Expression (Abb.15). Auffällig jedoch war das Auftreten einer 2. Bande (410 bp) bei der Verwendung des Caspase 2 Primers. Ein Vergleich der mRNA aus den beiden Gehirnregionen mit mRNA aus dem Thymus einer adulten Ratte zeigte deutliche Expressionsunterschiede (Abb.16). Waren in den Gehirnnarealen beide Banden von gleicher Intensität, so war im Thymus eine deutliche Verschiebung der Intensität in Richtung des kleineren Produkts feststellbar (vgl. Kapitel III. 4.2.).

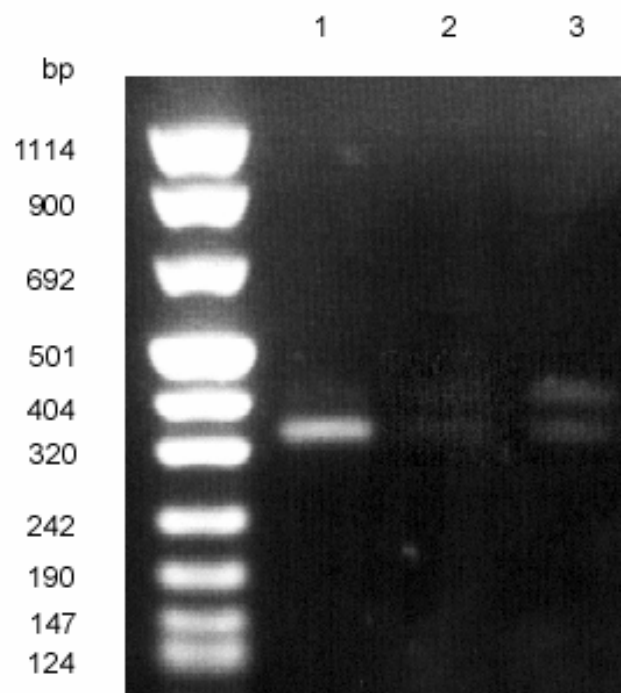


Abb. 16: RT-PCR zum Nachweis unterschiedlicher Caspase 2 Splicevarianten im Gehirn adulter Ratten

(1 = Thymus; 2 = Cortex; 3 = BO)

4.2. Klonierung einer Nedd 2 Splicevariante

Die bei RT-PCR, unter Verwendung des Caspase 2 Primers detektierte zweite Bande (410 bp), wurde kloniert und sequenziert. Das Sequenzierungsergebnis dokumentierte, dass es sich hierbei um eine Splicevariante der Caspase 2 handelte (Abb. 17).

casp2 . sen

```

TTCAGAATTTTGCACAGTTACCTGCACACCGGGTCACAGACTCCTGCATA  50
GTAGCACTCCTCTCACATGGTGTGGAAGGTGGCATCTACGGGGTGGATGG  100
CAAAC TGCTTCAGCTCCAAGAGGTTTTTCGACTTTTCGACAATGCTAACT  150
GTCCAAGTCTACAGAACAAACCAAAAATGTTCTTCATCCAAGCATGTCGT  200
GGAGGTGCTATTGGATCCCTTGGGACCTCCTTCTGTTCACTGCTGCCACC 250
                                     STOP      INTRON-SEQUENZ
GCCTCTCTTGCTCTATGAGACAGATAGAGGGGTGACCAGCAAGATGGAA  300
AGAACCATGCACAATCCCCTGGATGTGAGGAGAGTGATGCTGGCAAGGAG  350
GAATTAATGAAGATGAGACTTCCTACTCGCTCAGACATGATATGTGGCTA 400
TGCAA                                                    casp2 . ase  405
  
```

Abb. 17: Sequenz des Nedd2-Gens einer Ratte

Die Sequenz entsprach zu 100 % der bekannten Sequenz der Maus. Bei dieser Splicevariante handelt es sich um Ich-1_s, einer um 61 bp längeren Variante von Caspase 2 (Ich-1_L). Durch diese Insertion kommt es zu einem früheren Translationsabbruch und damit zu der Produktion eines um 123 Aminosäuren kleineren Proteins, das im Gegensatz zu Ich-1_L anti-apoptotisch wirkt. (Abb. 18)

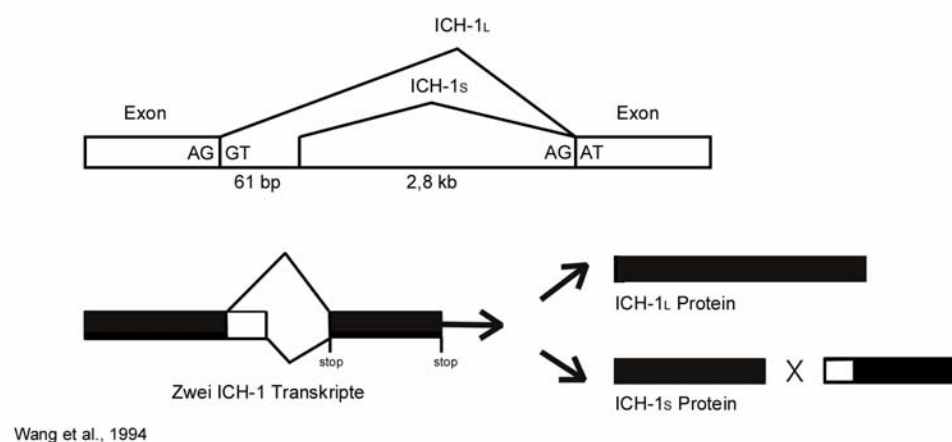


Abb. 18: Caspase 2 (ICH-1) wird als 2 unterschiedliche Splicevarianten exprimiert.

4.3. *In situ* Hybridisierung

Um die genaue anatomische Verteilung der Expression verschiedener Caspasen festzustellen, wurden *in situ* Hybridisierungen verwendet. Das besondere Augenmerk wurde auf Regionen der adulten Neurogenese gelegt. Es wurden Hybridisierungen gegen Caspase 2 und 3 durchgeführt, da hier bei der RT-PCR eine Hochregulierung in Zonen adulter Neurogenese festgestellt werden konnte. Die Hybridisierungen zeigten bei beiden Caspasen ein identisches Expressionsschema. Es war deutlich eine Expression in der GCL des GD erkennbar (Abb. 19).

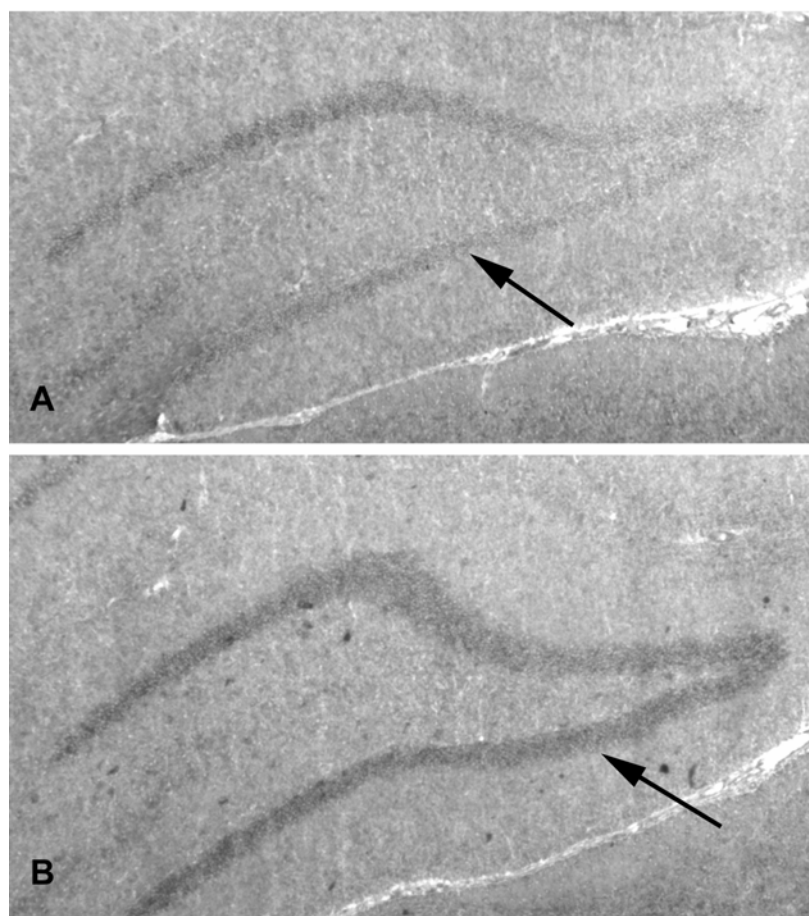


Abb. 19: Expression von Caspase 2 (A) und Caspase 3 (B) im GD des Hippocampus adulter Ratten

Im System SVZ/RMS/BO war ebenfalls partiell eine Expression sichtbar. Der RMS und die GCL des BO wiesen ein deutliches Signal auf. Auch in der GL des BO zeigte ein

positives Signal, das Vorhandensein von Caspase 2 bzw. Caspase 3 an. Im Gegensatz dazu war in der SVZ kein Signal nachweisbar (Abb. 20).

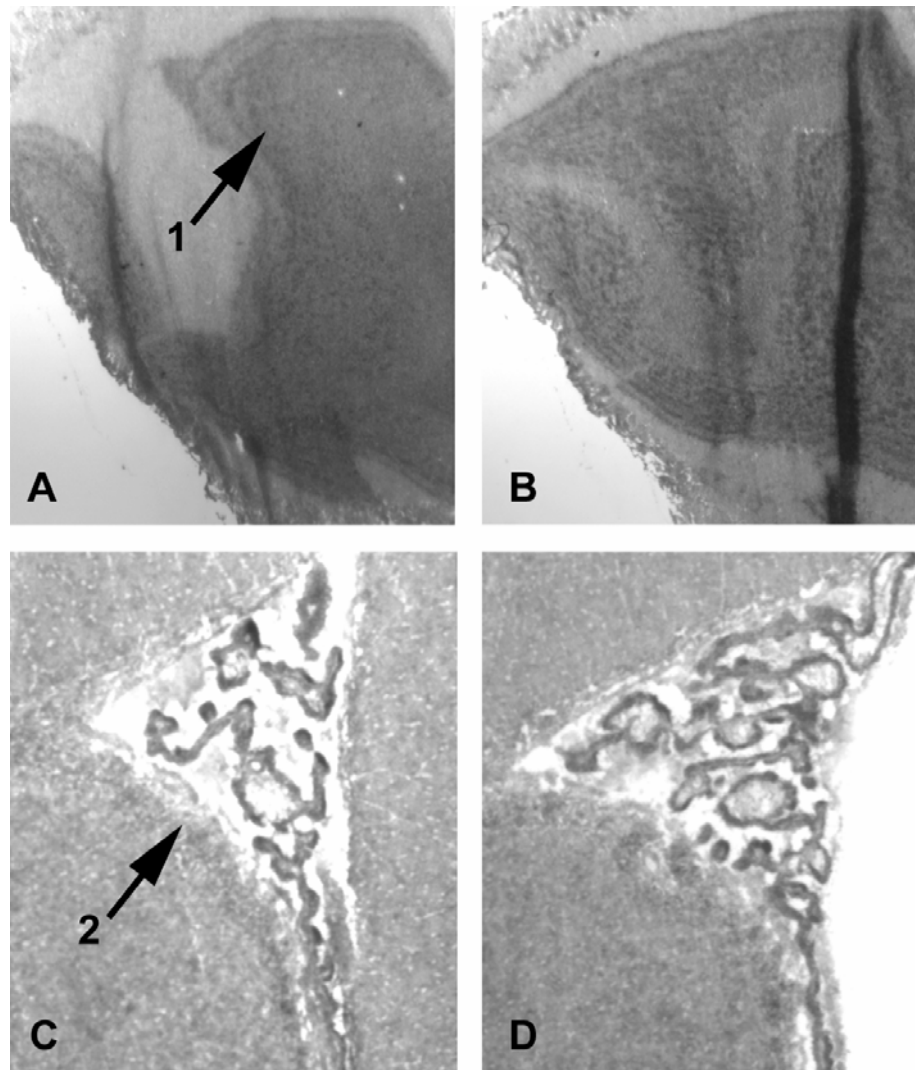


Abb. 20: Expression von Caspase 2 und 3 im System SVZ/RMS/OB

Mittels *in situ* Hybridisierung ist die Expression von Caspase 2 (A, C) und Caspase 3 (B, D) in der GCL des BO (1) nachweisbar. Die SVZ (2) des Seitenventrikels zeigte im Gegensatz zu anderen Zonen der Neurogenese keine Expression der untersuchten Caspasen.

4.4. Nachweis der Aktivierung von Caspase 3

4.4.1. Western Blot

Zum Nachweis der Aktivierung der Caspase 3 wurde ein Zellextrakt, sowohl aus Zellen des BO, als auch aus Zellen des Cortex adulter Ratten gewonnen. Die Analyse dieser Extrakte mittels Western Blotting, unter Verwendung eines spezifisch gegen die aktive Form der Caspase 3 gerichteten Antikörpers, zeigte bei der BO Probe eine positive Reaktion. Diese blieb bei der Cortex Probe aus (Abb. 21). Es konnte sowohl das 32 kDa Proenzym, als auch die beiden Untereinheiten (17 bzw. 12 kDa) der aktivierten Caspase 3 detektiert werden. Die auf dem Gel sichtbaren zusätzlichen Banden gehen laut Hersteller des Antikörpers (R&D Systems; Minneapolis, USA) auf weitere apoptotische Abbauprodukte zurück und haben keinen Einfluss auf das Ergebnis. Material aus anderen Zonen der Neurogenese wurde nicht untersucht, da bei diesen eine gezielte, quantitative Entnahme von Gewebe nicht möglich war.

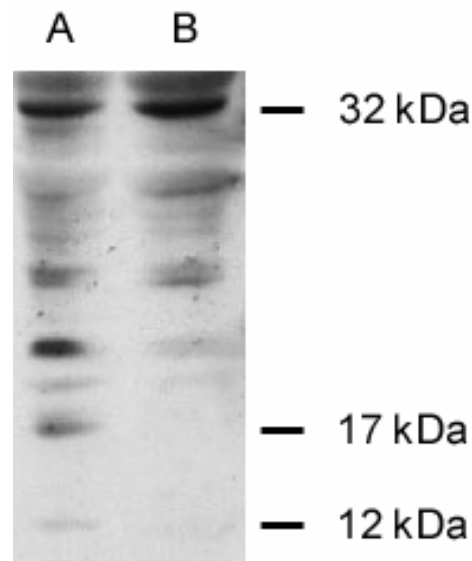


Abb. 21: Western Blot gegen aktive Caspase 3 zeigte ein positives Signal bei Proben aus dem BO (A). Bei der Proteinprobe des Cortex (B) ist keine Reaktion detektierbar.

4.4.2. Immunhistologischer Nachweis

Da mit der *in situ* Hybridisierung nur eine Hochregulierung der mRNA Expression, jedoch nicht die Aktivierung der Caspase und mit dem Western Blot nur die Tatsache der Aktivierung und nicht die Lokalisierung der aktiven Caspase 3 nachgewiesen werden konnte, wurde eine Immunfärbung gegen die aktivierte Form der Caspase 3 durchgeführt. Da kein rattenspezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurden die notwendigen Färbungen auf 25 µm dicken mit dem Schlittenmikrotom gewonnenen Schnitten eines Mäusegehirns durchgeführt. Auffällig war die Verteilung der positiven Zellen. So konnte, wie aus Abb.22 deutlich ersichtlich ist, die Grenzschicht zwischen Hilus und der GCL des GD als Zone identifiziert werden, in der eine starke Aktivität von Caspase 3 zu erkennen ist. Ebenfalls deutlich positiv waren Zellen in den anderen Zonen der Neurogenese (SVZ/RMS/OB).

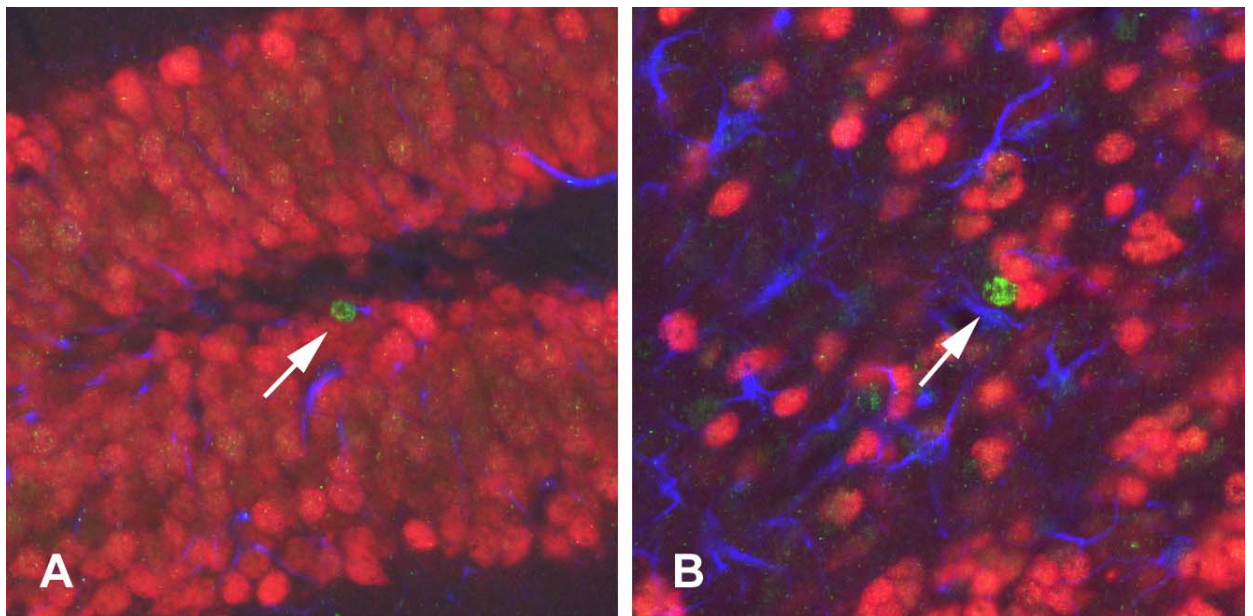


Abb. 22: Nachweis von aktiver Caspase 3 (grün) im GD (A) und BO (B) adulter Mäuse. Die Gegenfärbung erfolgte sowohl mit dem neuronalen Marker NeuN (rot), als auch dem glialen Marker GFAP (blau).

5. Charakterisierung sterbender Zellen

Ein weiterer Aspekt, der in Zusammenhang mit der Analyse des potentiellen Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose steht, ist die Charakterisierung der apoptotischen Zellen. Um feststellen zu können, um welchen Zelltyp es sich bei den apoptotischen Zellen handelt, wurde TUNEL mit Immunfärbungen unter der Verwendung verschiedener Marker kombiniert. So wurde sowohl ein glialer (S100 β), als auch ein neuronaler (NeuN) Marker verwendet. Bei der Auswertung mittels konfokaler Lasermikroskopie konnte keine Doppelmarkierung von TUNEL und glialem Marker detektiert werden. Vereinzelt konnten TUNEL-positive Zellen beobachtet werden, die auch neuronal ausdifferenziert waren (Abb.23). Aufgrund der geringen Häufigkeit wurde jedoch auf eine umfangreiche Quantifizierung verzichtet.

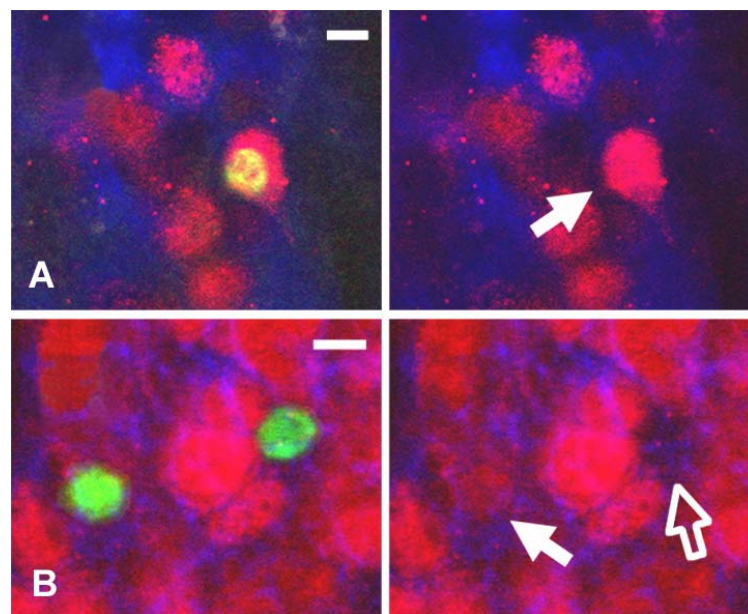


Abb. 23: Doppelmarkierung apoptotischer Zellen

Bei Kombination der TUNEL-Färbung mit anderen histologischen Markern [blau = S100 β (glial); rot = NeuN (neuronal)] konnte bei einigen Zellen sowohl ein TUNEL- als auch neuronales Signal detektiert werden (Pfeil weiß). Eine Kombination der TUNEL-Färbung mit dem glialen Marker wurde auf keinem der Schnitte entdeckt. Ein Großteil der TUNEL-positiven Zellen war jedoch mit keinem der anderen Markern übereinstimmend (Pfeil leer).

(Balken: 5 μ m)

6. Modulation des Zelltodes in Zonen der Neurogenese

6.1. Infusion eines Caspase-Inhibitors in den Seitenventrikel

Zur genauen Untersuchung einer potentiellen Modulation der Apoptoserate wurde intraventrikulär ein Apoptose-Inhibitor (BAF= Boc-Asp[Ome]-FMK) injiziert (Versuchsablauf und Details vgl. Kapitel II. 8.1).

6.1.1. Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen

Der Einfluss des injizierten Inhibitors wurde an 4 Gruppen adulter Ratten untersucht. Es wurden 24 h bzw. 4 Wochen nach der letzten Injektion jeweils eine Gruppe der mit Inhibitor injizierten Ratten, sowie eine Kontrollgruppe perfundiert und analysiert.

6.1.1.1. Gyrus dentatus

Eine quantitative Analyse der BrdU-positiven, neugebildeten Zellen in der GCL des GD zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Es konnte weder eine erhöhte Proliferation (24 h nach Injektion), noch ein gesteigertes Überleben (4 Wochen später) der neugebildeten Zellen festgestellt werden (Abb. 24, Tab.4)

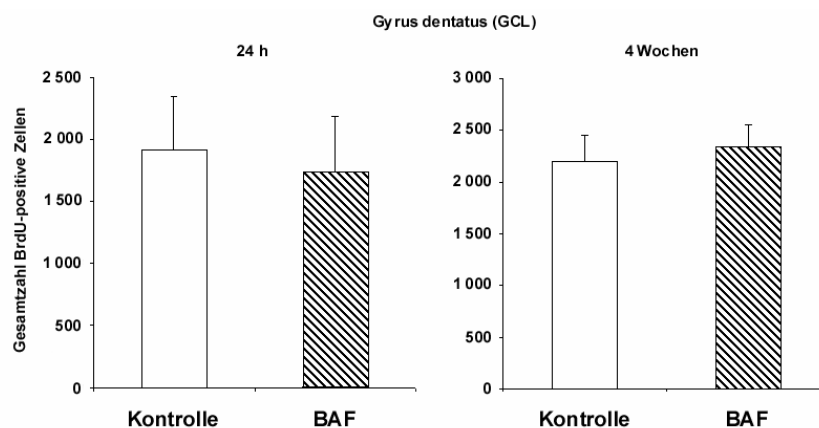


Abb. 24: Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen im GD (GCL)

Gyrus dentatus (GCL) 24 h			
Kontrolle	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	1 912 ± 425 (SEM)	p > 0,05
n = 9	Volumen [mm ³]	0,427 ± 0,016	p > 0,05
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	4 451 ± 946	p > 0,05
Inhibitor	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	1 722 ± 468	
n = 9	Volumen [mm ³]	0,403 ± 0,012	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	4 375 ± 1297	

Gyrus dentatus (GCL) 4 Wochen			
Kontrolle	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	2 120 ± 254	p > 0,05
n = 10	Volumen [mm ³]	0,401 ± 0,008	p > 0,05
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	5 527 ± 665	p > 0,05
Inhibitor	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	2 335 ± 211	
n = 10	Volumen [mm ³]	0,403 ± 0,011	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	5 763 ± 454	

Tab.4: Übersicht über Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen im GD (GCL)

6.1.1.2. SVZ/RMS/BO

Die Analyse im System SVZ/RMS/BO war sowohl zeitlich, als auch lokal getrennt. Das heißt, die Proliferation wurde 24 h nach der letzten Injektion in der SVZ quantifiziert. Das Überleben hingegen wurde 4 Wochen später im BO analysiert. Es wurden neben der GCL auch die GL und die externe plexiforme Schicht (EPL) untersucht. Ähnlich wie im GD ergab die quantitative Analyse des Systems SVZ/RMS/BO keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl der BrdU-positiven Zellen (Abb. 25, Tab. 5).

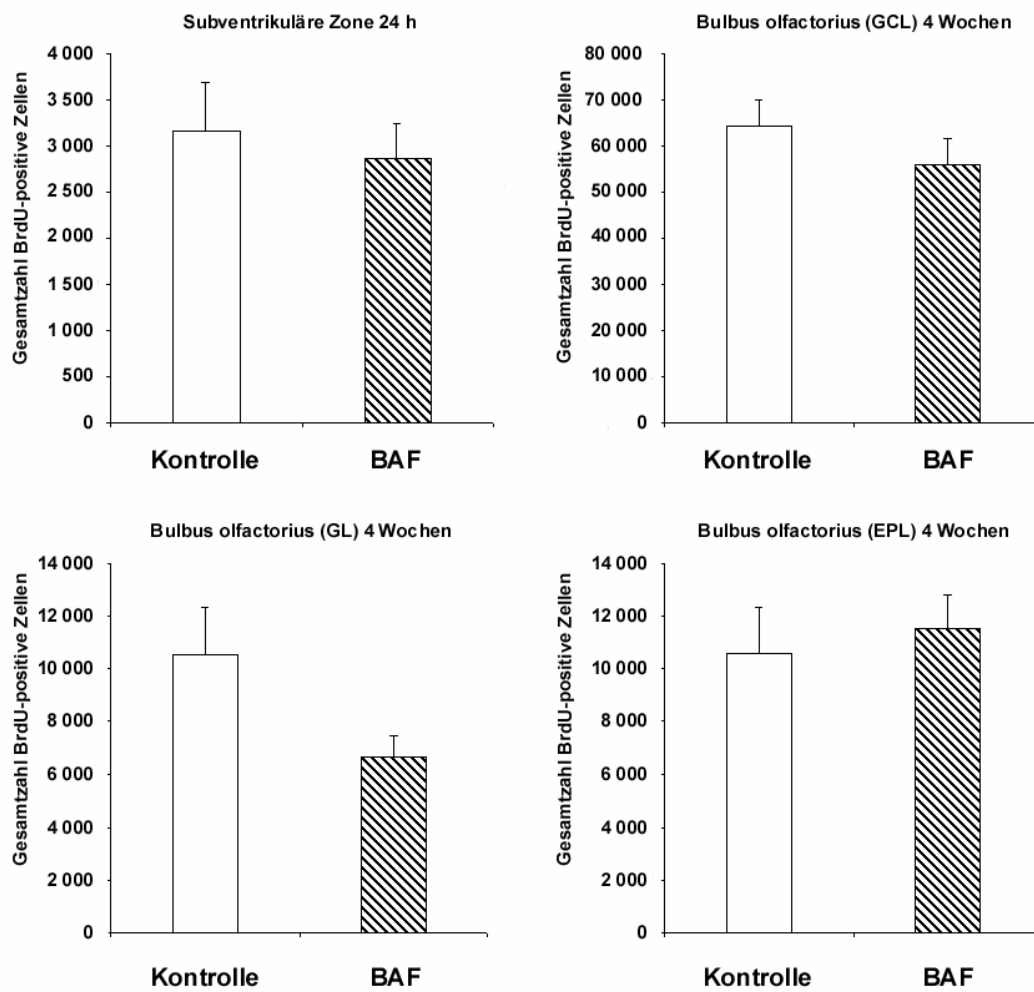


Abb. 25: Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen im System SVZ/RMS/BO

Subventrikuläre Zone 24 h				Bulbus olfactorius (GL) 4 Wochen			
Kontrolle	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	3 155 ± 526 (SEM)	p > 0,05	Kontrolle	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	10 537 ± 1 776	p > 0,05
n = 9	Volumen [mm ³]	0,057 ± 0,003	p > 0,05	n = 9	Volumen [mm ³]	3,396 ± 0,236	p > 0,05
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	56 591 ± 9 792	p > 0,05		Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	3 012 ± 306	p > 0,05
Inhibitor	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	2 866 ± 361		Inhibitor	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	6 688 ± 780	
n = 9	Volumen [mm ³]	0,059 ± 0,005		n = 10	Volumen [mm ³]	3,092 ± 0,208	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	51 415 ± 7 624			Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	2 183 ± 230	

Bulbus olfactorius (GCL) 4 Wochen				Bulbus olfactorius (EPL) 4 Wochen			
Kontrolle	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	64 249 ± 5 504	p > 0,05	Kontrolle	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	10 564 ± 1 757	p > 0,05
n = 9	Volumen [mm ³]	6,818 ± 0,219	p > 0,05	n = 9	Volumen [mm ³]	5,699 ± 0,316	p > 0,05
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	9 406 ± 707	p > 0,05		Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	1 797 ± 234	p > 0,05
Inhibitor	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	55 826 ± 5 673		Inhibitor	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	11 523 ± 1 236	
n = 10	Volumen [mm ³]	6,494 ± 0,142		n = 10	Volumen [mm ³]	5,961 ± 0,234	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	8 584 ± 820			Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	1 906 ± 153	

Tab 5: Übersicht über Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen im System SVZ/RMS/BO

6.1.2. Zelltod

Neben der Untersuchung des Einflusses der Injektion des Apoptose-Inhibitors auf die Proliferation sollte im Rahmen eines Experiments auch der direkte Effekt auf den Zelltod in den beiden Regionen der Neurogenese untersucht werden. Hierbei wurden jedoch nur die beiden Gruppen analysiert, die 24 h nach der letzten Injektion perfundiert wurden. Auf die Untersuchung der 4 Wochen Tiere wurde verzichtet, da der injizierte Inhibitor nach so langer Zeit im Organismus nicht mehr aktiv (Halbwertszeit bei 37°C: ca. 24 h) und deshalb kein Effekt auf die Quantifizierung des Zelltods zu erwarten ist.

6.1.2.1. Gyrus dentatus

Die stereologische Quantifizierung sterbender TUNEL-positiver Zellen ergab einen deutlichen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 26).

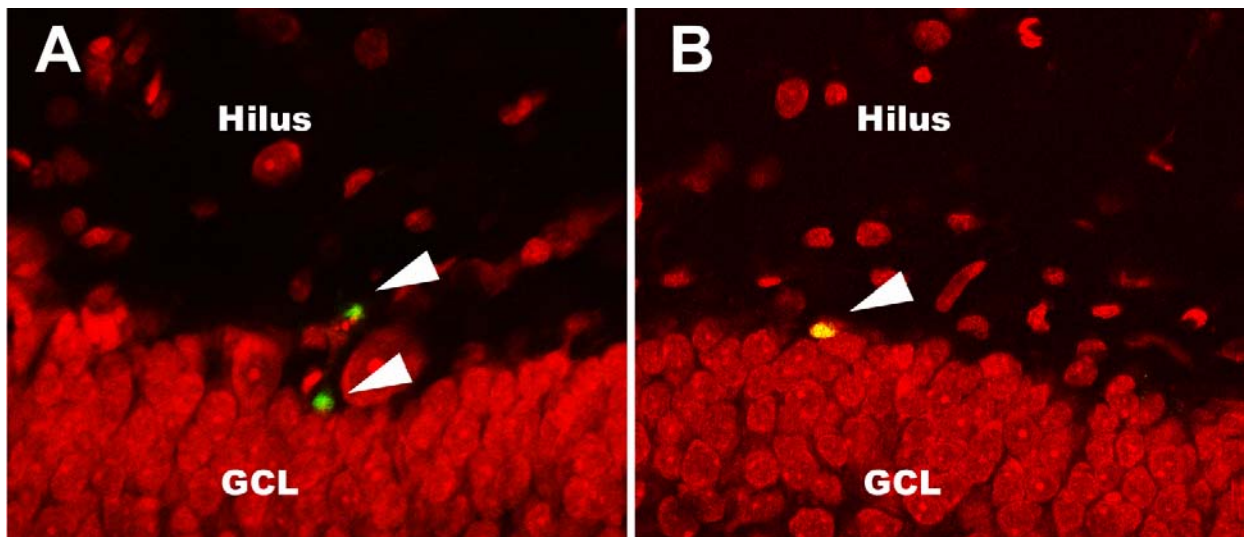


Abb. 26: Sterbende Zellen im GD

Inhibitor-injizierte Ratten (B) zeigten gegenüber der Kontrollgruppe (A) eine deutlich reduzierte Zahl sterbender Zellen im GD (grün = TUNEL; rot = Propidiumjodid-Gegenfärbung).

Im GD (GCL) von Ratten, die den Apoptose-Inhibitor BAF injiziert bekamen, wurde eine signifikante Reduktion des Zelltods nachgewiesen. So konnte eine um 62 % reduzierte Zahl an TUNEL-positiven Zellen nachgewiesen werden (Abb. 27, Tab. 6).

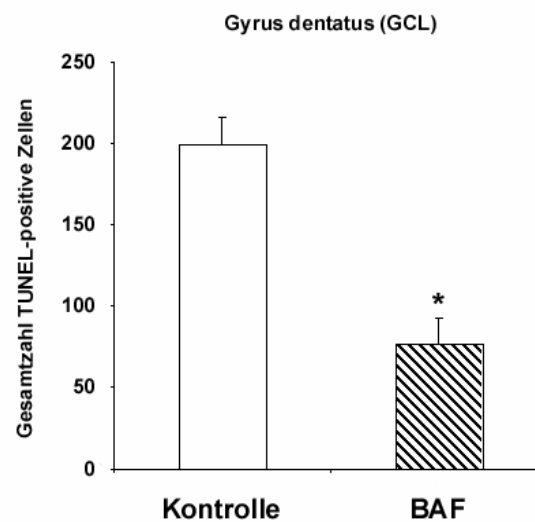


Abb. 27: Reduzierter Zelltod im GD nach Inhibitor-Injektion

Gyrus dentatus (GCL) 24 h			
Kontrolle	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	199 ± 17 (SEM)	p < 0,0005
n = 6	Volumen [mm ³]	0,438 ± 0,023	p > 0,05
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	466 ± 52	p = 0,0005
Inhibitor	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	77 ± 15	
n = 8	Volumen [mm ³]	0,414 ± 0,013	
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	184 ± 34	

Tab. 6: Quantitative Übersicht der Zelltodreduzierung im GD nach Inhibitor-Injektion

6.1.2.2. SVZ/RMS/BO

Der quantitative, stereologische Vergleich zwischen Ratten, die mit BAF behandelt wurden, und Tieren aus der Kontrollgruppe zeigte auch hier deutliche Unterschiede in der Zelltodrate (Abb. 28). Es wurde eine signifikante Reduktion des Zelltods festgestellt (Abb. 29). Die Analyse der SVZ ergab eine Senkung der detektierbaren sterbenden Zellen von 387 ± 58 bei der Kontrollgruppe auf 158 ± 22 bei der mit Inhibitor injizierten Gruppe. Dies bedeutet einen Rückgang um 59 %.

Die Ergebnisse der Untersuchung des BO dokumentierten ein vergleichbares Resultat. So konnte in der GCL eine Reduktion von 2105 ± 174 detektierbaren Zellen auf 1081 ± 185 nachgewiesen werden. Dies entspricht einer signifikanten Abnahme von ca. 49 %.

Die GL zeigte eine Reduktion von 429 ± 73 auf 197 ± 34 (54 %) und die EPL von 136 ± 22 auf 73 ± 11 (46 %) gegenüber der Kontrollgruppe (Tab. 7).

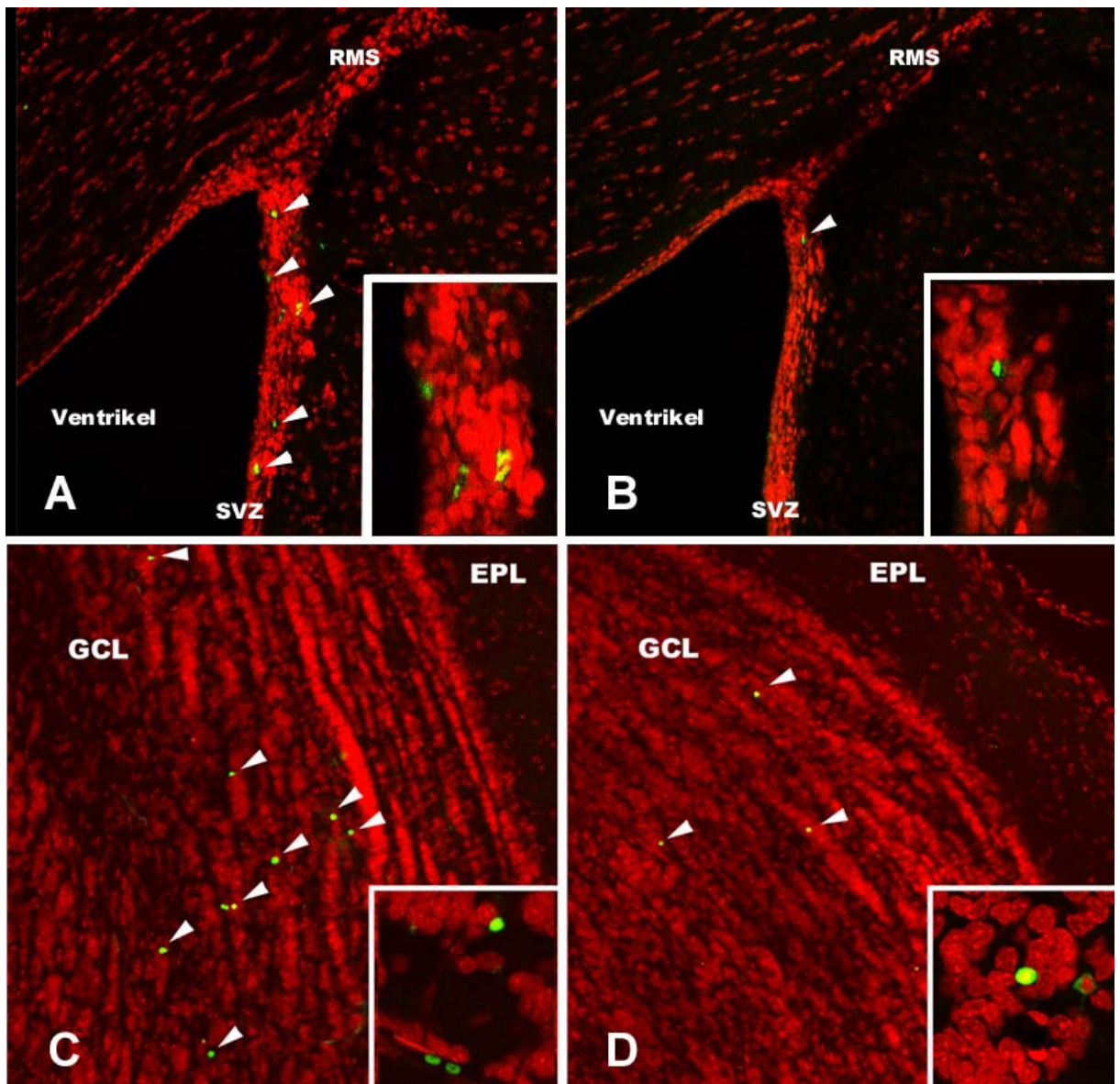


Abb. 28: Sterbende Zellen in der SVZ und dem BO (GCL)

Ratten der mit Inhibitor injizierten Gruppe (B, D) zeigten eine deutliche Reduktion der TUNEL-positiven Zellen gegenüber der Kontrollgruppe (A, C).

(grün = TUNEL; rot = Propidiumjodid-Gegenfärbung)

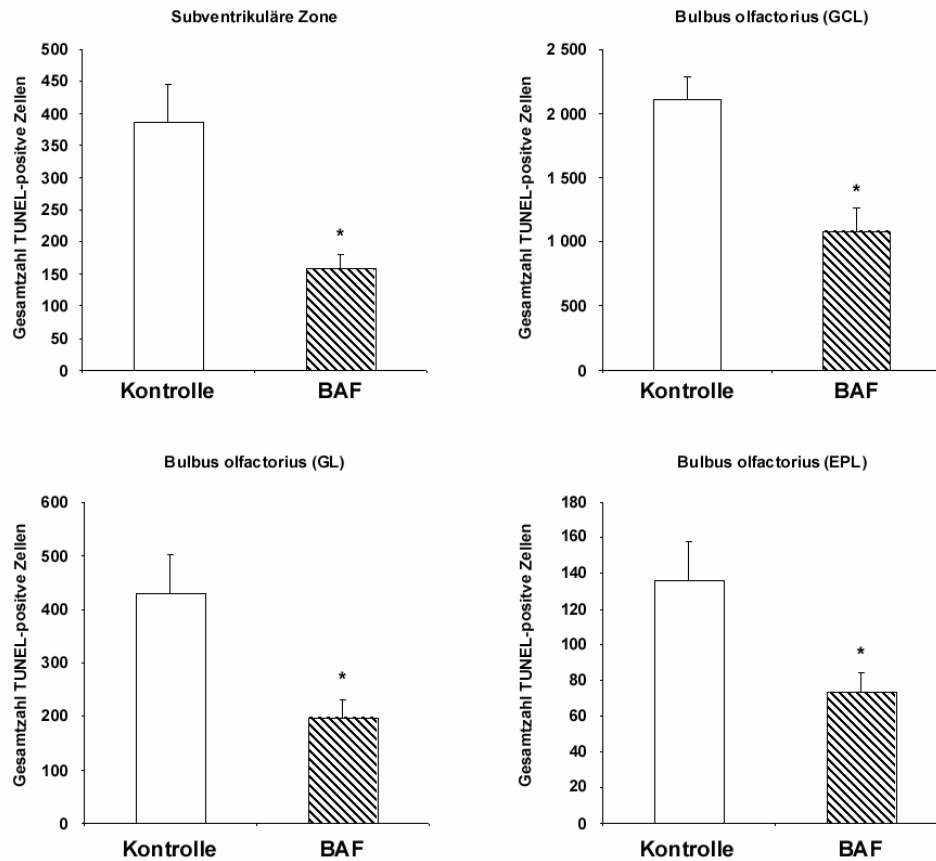


Abb 29: Reduzierter Zelltod im System SVZ/RMS/BO nach Inhibitor-Injektion

Subventrikuläre Zone			
Kontrolle	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	387 ± 58 (SEM)	p < 0,005
n = 8	Volumen [mm ³]	0,055 ± 0,003	p > 0,05
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	6 863 ± 813	p < 0,0005
Inhibitor	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	158 ± 22	
n = 8	Volumen [mm ³]	0,060 ± 0,006	
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	2 635 ± 262	

Bulbus olfactorius (GL)			
Kontrolle	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	429 ± 73	p < 0,05
n = 9	Volumen [mm ³]	2,196 ± 0,240	p > 0,05
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	198 ± 32	p < 0,05
Inhibitor	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	197 ± 34	
n = 10	Volumen [mm ³]	2,284 ± 0,180	
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	89 ± 16	

Bulbus olfactorius (GCL)			
Kontrolle	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	2 105 ± 174	p < 0,001
n = 9	Volumen [mm ³]	5,109 ± 0,191	p > 0,05
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	415 ± 35	p < 0,005
Inhibitor	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	1 081 ± 185	
n = 10	Volumen [mm ³]	5,071 ± 0,127	
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	213 ± 37	

Bulbus olfactorius (EPL)			
Kontrolle	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	136 ± 22	p < 0,05
n = 9	Volumen [mm ³]	2,300 ± 0,150	p < 0,05
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	58 ± 8	p < 0,005
Inhibitor	Gesamtzahl TUNEL-positive Zellen	73 ± 11	
n = 10	Volumen [mm ³]	2,802 ± 0,072	
	Dichte [TUNEL-positive Zellen/mm ³]	26 ± 4	

Tab. 7: Quantitative Übersicht der Zelltodreduzierung im System SVZ/RMS/BO nach Inhibitor-Injektion

6.1.3. Versuch der Identifizierung sterbender Zellen

Zur näheren Charakterisierung der sterbenden Zellen wurde eine Reihe von Zellmarkern (z.B. NeuN = neuronal, GFAP = glial, S100 β = glial, β -III-Tubulin = junge Neuronen, Nestin = Stamm- und Vorläuferzellen) in Kombination mit TUNEL verwendet. Mit Ausnahme einer geringen Zahl NeuN positiver Zellen konnten keine Doppelmarkierungen detektiert werden (vgl. Kapitel III. 5.).

6.2. Analyse transgener Bcl-2 überexprimierender Mäuse

6.2.1. Volumen, Zellzahl und Zelldichte der Granulärzellschichten von Gyrus dentatus und Bulbus olfactorius

Da die Expression des Bcl-2 Proteins bereits sehr früh in der Entwicklung nachweisbar und demnach damit zu rechnen ist, dass während der gesamten Entwicklungsperiode ein Einfluss auf das Überleben neugeborener Granulärzellen besteht, wurden Volumen, Zelldichte und Gesamtzellzahl der Granulärzellschichten von GD und BO bestimmt und mit Wildtyp-Mäusen gleichen Alters verglichen. Hierfür wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt (Abb. 31) und stereologisch ausgewertet.

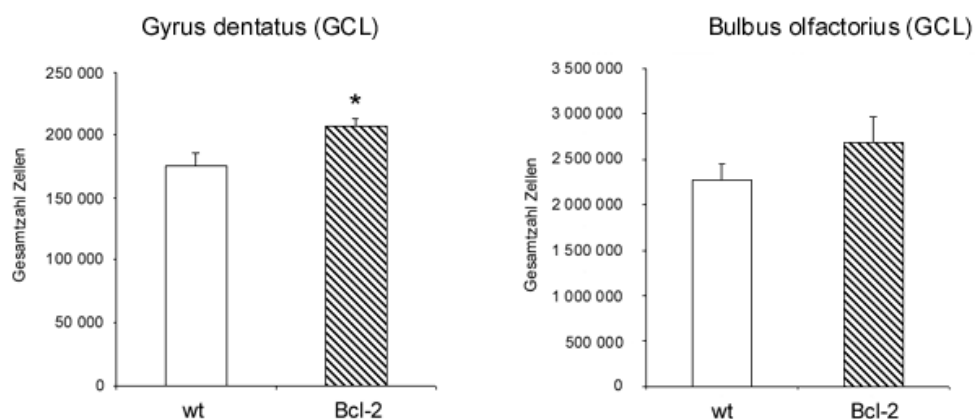


Abb. 30: Im Gegensatz zur Gesamtzellzahl in der GCL des BO, die bei den transgenen Tieren nur tendenziell erhöht ist, zeigt diese im GD eine signifikante Erhöhung.

Die Bestimmung der Zelldichten in den Granulärzellschichten und des Volumens von BO und GD wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Gesamtzellzahl in der GCL des GD erwies sich jedoch als signifikant größer als die von Wildtyp-Mäusen (17 %; $p=0,038$). In der GCL des BO ist ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der Gesamtzellzahl feststellbar. Diese zeigte sich jedoch statistisch nicht signifikant (18 %; $p=0,159$).

Gyrus dentatus			
Wildtyp	Gesamtzellzahl	$175\,671 \pm 10\,292$ (SEM)	$p < 0,05$
n = 6	Volumen [mm^3]	$0,217 \pm 0,010$	$p > 0,05$
	Dichte [Zellen/ mm^3]	$810\,904 \pm 28\,876$	$p > 0,05$
Bcl-2	Gesamtzellzahl	$206\,293 \pm 7\,178$	
n = 6	Volumen [mm^3]	$0,237 \pm 0,012$	
	Dichte [Zellen/ mm^3]	$873\,362 \pm 19\,751$	

Bulbus olfactorius (GCL)			
Wildtyp	Gesamtzellzahl	$2\,275\,355 \pm 176\,963$	$p > 0,05$
n = 5	Volumen [mm^3]	$2,577 \pm 0,158$	$p > 0,05$
	Dichte [Zellen/ mm^3]	$880\,307 \pm 27\,168$	$p > 0,05$
Bcl-2	Gesamtzellzahl	$2\,690\,512 \pm 281\,897$	
n = 7	Volumen [mm^3]	$3,092 \pm 0,224$	
	Dichte [Zellen/ mm^3]	$858\,972 \pm 42\,326$	

Tab. 8: Vergleich der Zellgesamtzahlen, der Volumina und der Zelldichten im GD und BO (GCL) adulter Wildtyp-Mäuse und transgener Bcl-2 überexprimierender Mäuse

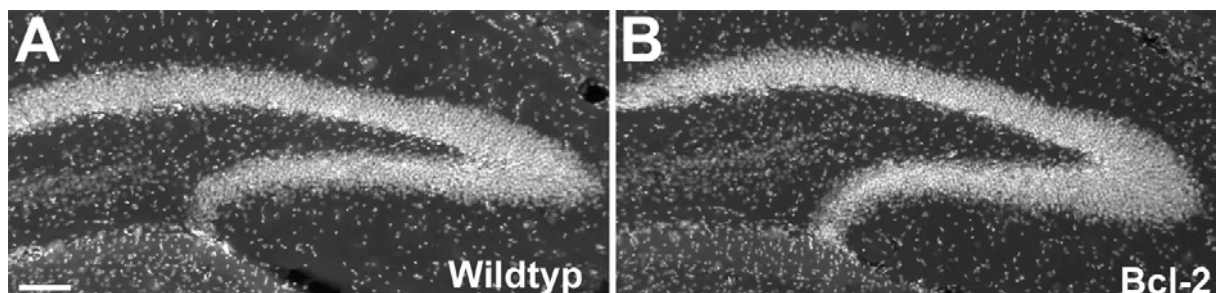


Abb. 31: Mikroskopische Darstellung (DAPI) der GD beider untersuchter Gruppen

Bcl-2 überexprimierende Tiere weisen im GD eine signifikant erhöhte Anzahl von Granulärzellen auf.

(Balken: 100 μm)

6.2.2. Zellproliferation und Etablierung neuer Zellen

Zur Detektion neugebildeter Zellen wurde transgenen bzw. Wildtyp-Mäusen einmalig BrdU injiziert, die so markierten Zellen immunhistologisch detektiert und mittels Stereologie quantifiziert. Untersucht wurden der GD und das System SVZ/RMS/BO. Um die Proliferation, also die Neubildung von Zellen, bestimmen zu können, wurden die Gehirne von Tieren analysiert, die 24 h nach der BrdU-Injektion perfundiert wurden. Es wurde die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen in der GCL des GD und in der SVZ ermittelt. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass ebenfalls eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Vergrößerung des Volumens der SVZ festgestellt wurde [(20 %; $p > 0,05$), vgl. 7.2.1. für GD und BO]. In beiden Strukturen der transgenen Versuchsgruppe wurde eine deutlich erhöhte Produktion neuer Zellen festgestellt (Abb. 32, 33). Wie in Tab. 9 dargelegt, zeigte die Analyse des GD zwar eine Erhöhung BrdU-positiver Zellen (24 %; $p > 0,05$), diese war im Gegensatz zur Produktionssteigerung in der SVZ statistisch nicht signifikant. In der SVZ wurde eine deutliche signifikante Erhöhung um 42 % ($p < 0,02$) festgestellt.

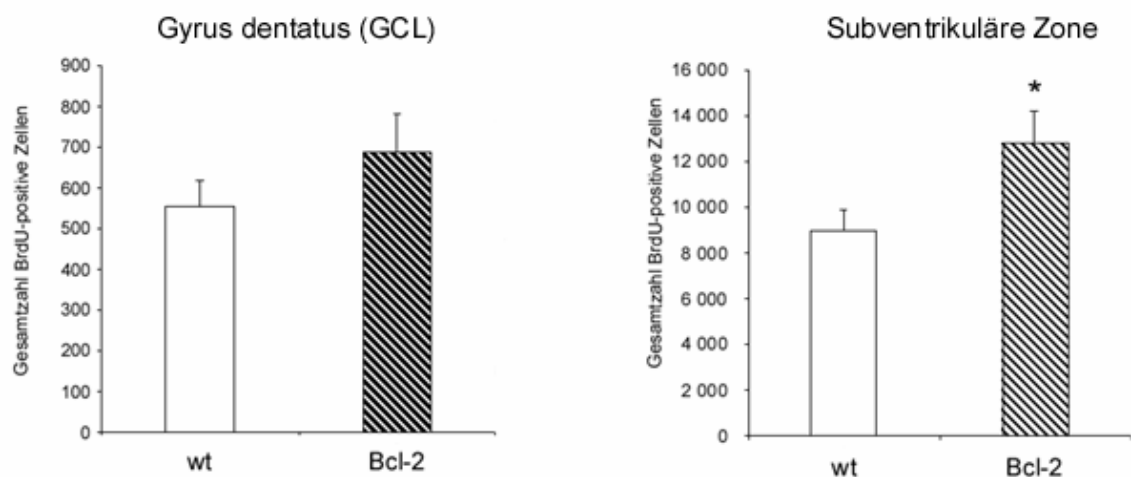


Abb. 32: In der SVZ Bcl-2 überexprimierender Mäuse konnte eine signifikant erhöhte Proliferation festgestellt werden. Im GD (GCL) konnte zwar eine erhöhte Proliferation detektiert werden, die jedoch statistisch kein signifikantes Niveau erreichte.

Gyrus dentatus			
Wildtyp	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	555 ± 63 (SEM)	p > 0,05
n = 6	Volumen [mm ³]	0,217 ± 0,010	p > 0,05
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	2 641 ± 396	p > 0,05
Bcl-2	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	689 ± 94	
n = 6	Volumen [mm ³]	0,242 ± 0,016	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	3 155 ± 674	

Subventrikuläre Zone			
Wildtyp	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	8 996 ± 875	p < 0,05
n = 7	Volumen [mm ³]	0,107 ± 0,008	p > 0,05
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	86 501 ± 10 718	p > 0,05
Bcl-2	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	12 780 ± 1 414	
n = 7	Volumen [mm ³]	0,129 ± 0,011	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	97 826 ± 5 190	

Tab. 9: Vergleich der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen, des Volumens und der Dichte BrdU-positiver Zellen im GD und in der SVZ adulter Wildtyp-Mäuse und transgener Bcl-2 überexprimierender Mäuse (24 h nach Injektion)

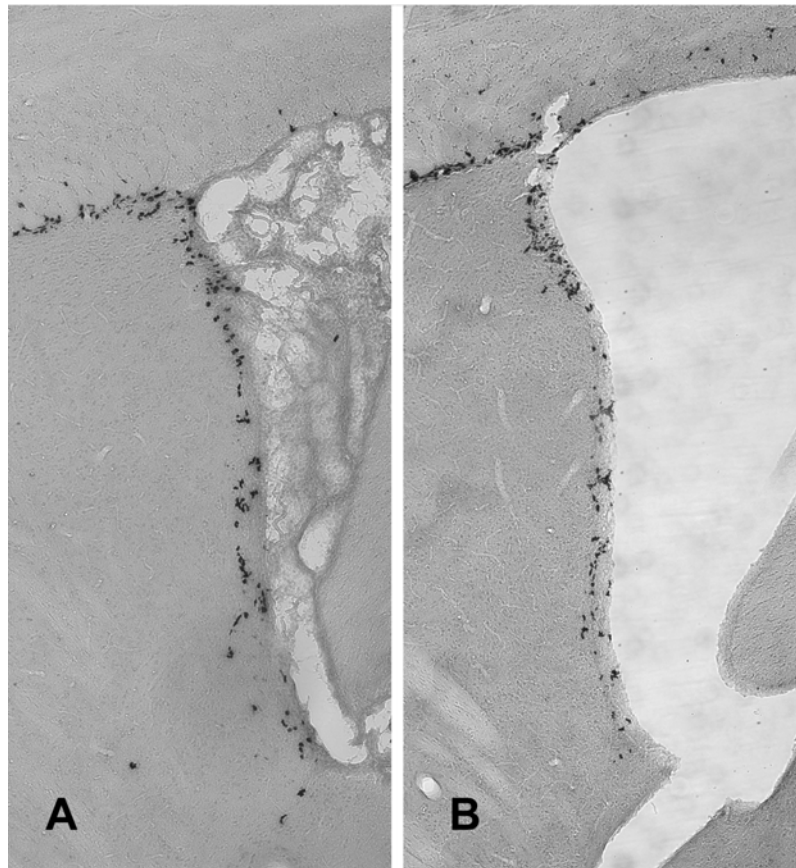


Abb. 33: In der SVZ der transgenen Untersuchungsgruppe (B) konnte 24 h nach Injektion von BrdU eine signifikant erhöhte Proliferation gegenüber den Wildtyp-Tieren (A) detektiert werden. Die augenscheinlich geringen Unterschiede konnten durch eine stereologische Quantifizierung klar nachgewiesen werden.

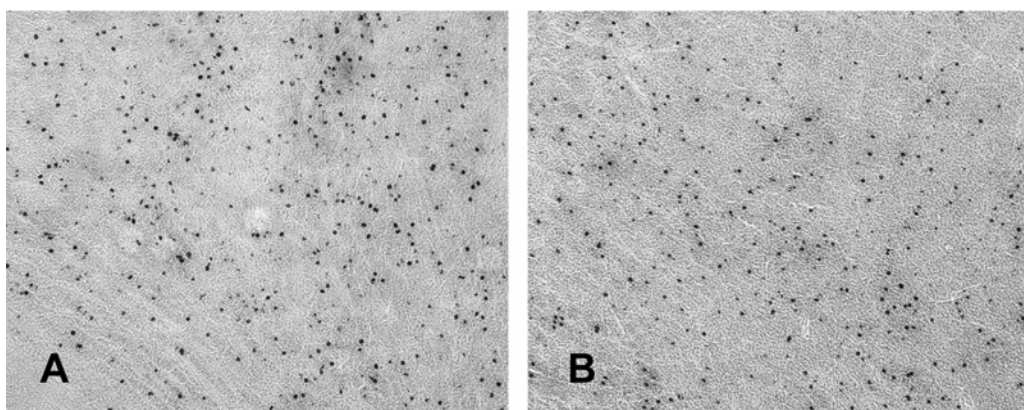


Abb. 34: 4 Wochen nach der Injektion von BrdU ist im BO (GCL) von Bcl-2 überexprimierenden Mäusen (B) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (A) keine signifikant erhöhte Anzahl neugebildeter Zellen nachweisbar.

Um feststellen zu können, ob es diesen neuen Zellen möglich war, zu überleben bzw. sich zu etablieren, wurden weitere Tiere untersucht, die 4 Wochen nach der BrdU-Injektion perfundiert wurden. Hier wurden die gleichen immunhistologischen und mikroskopischen Arbeitstechniken angewendet. Im System SVZ/RMS/BO wurde allerdings diesmal die GCL des BO ausgewählt, da sämtliche in der SVZ markierten Zellen mittlerweile über den RMS dort eingewandert sind. Tatsächlich sind in der SVZ auch keine BrdU-markierten Zellen mehr nachweisbar. Die Analyse des BO zeigte, dass es dort keine signifikante Erhöhung der BrdU-markierten Zellen gab (Tab10; Abb.34, 35). Im starken Gegensatz hierzu konnte im GD der transgenen Tiere eine um 108 % ($p < 0,05$) erhöhte Zahl an positiven Zellen detektiert werden (Tab. 10; Abb. 35, 36). Ebenso konnte eine Differenz der Strukturvolumina beider untersuchten Gruppen festgestellt werden. So zeigten die Granulärzellschichten der transgenen Gruppe eine signifikante Volumenerhöhung von 36 % im BO und sogar 52 % im GD gegenüber den Wildtyp-Mäusen (Tab. 10).

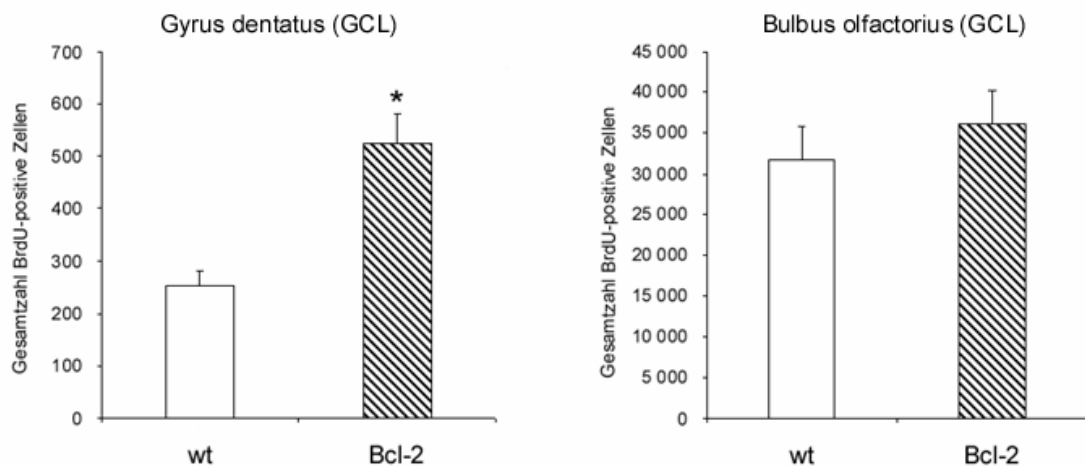


Abb. 35: Im GD (GCL) konnte 4 Wochen nach der BrdU Injektion eine deutlich erhöhte Anzahl an BrdU-positiven Zellen detektiert werden. Im BO konnte kein vergleichbarer Effekt festgestellt werden.

Gyrus dentatus			
Wildtyp	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	252 ± 30 (SEM)	p < 0,05
n = 4	Volumen [mm ³]	0,152 ± 0,010	p = 0,005
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	1476 ± 103	p = 0,115
Bcl-2	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	525 ± 55	
n = 4	Volumen [mm ³]	0,231 ± 0,009	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	2283 ± 253	

Bulbus olfactorius (GCL)			
Wildtyp	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	31 611 ± 4 214	p > 0,05
n = 3	Volumen [mm ³]	2,292 ± 0,112	p = 0,01
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	13 714 ± 1 350	p > 0,05
Bcl-2	Gesamtzahl BrdU-positive Zellen	36 060 ± 4 127	
n = 4	Volumen [mm ³]	3,138 ± 0,057	
	Dichte [BrdU-positive Zellen/mm ³]	11 543 ± 1 442	

Tab. 10: Vergleich der Gesamtzahl BrdU-positiver Zellen, des Volumens und der Dichte BrdU-positiver Zellen im GD und im BO (GCL) adulter Wildtyp-Mäuse und transgener Bcl-2 überexprimierender Mäuse (4 Wochen nach Injektion)

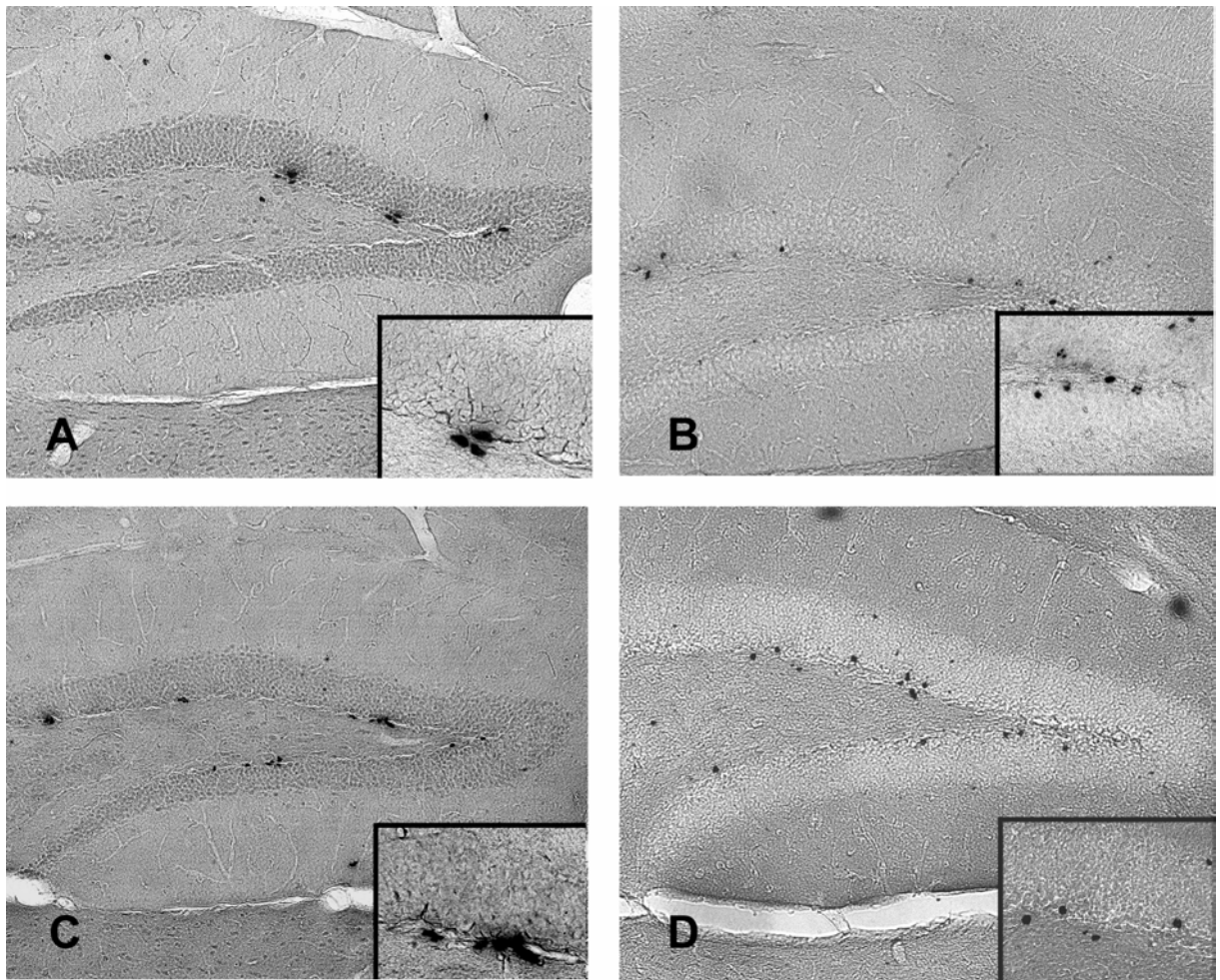


Abb. 36: 24 h nach der BrdU-Injektion konnte im GD kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen Wildtyp-Tieren (A) und Bcl2-transgenen Tieren (C) festgestellt werden. 4 Wochen später ist jedoch eine deutliche Differenz erkennbar. Bcl-2 überexprimierende Tiere (D) zeigen deutlich mehr BrdU-positive Zellen als Vertreter der Wildtyp-Gruppe (B).

6.2.3. Zelltod

Basierend auf dem signifikanten Unterschied der Anzahl BrdU-positiver Zellen im GD wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt, um festzustellen ob die Erhöhung an positiven Zellen auf eine Verminderung des programmierten Zelltodes oder auf einen Ausdünnungseffekt zurückzuführen ist. Die stereologische Untersuchung zeigte eine signifikante Reduktion der TUNEL-positiven Zellen um 55 % ($p < 0,02$) bei den transgenen Tieren, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Konnten in der GCL des GD von Wildtyp-Mäusen ($n = 4$) noch 141 ± 21 TUNEL-positive Zellen detektiert werden,

so konnten bei transgenen Bcl-2 überexprimierenden Mäusen ($n = 4$) im Schnitt nur 80 ± 8 solcher Zellen nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

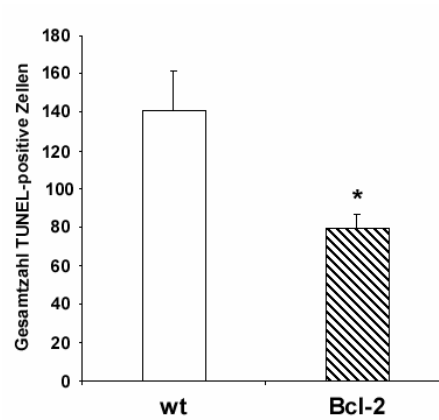


Abb. 37: Bcl-2 überexprimierende Mäuse zeigten eine deutliche Reduktion TUNEL-positiver Zellen im GD.

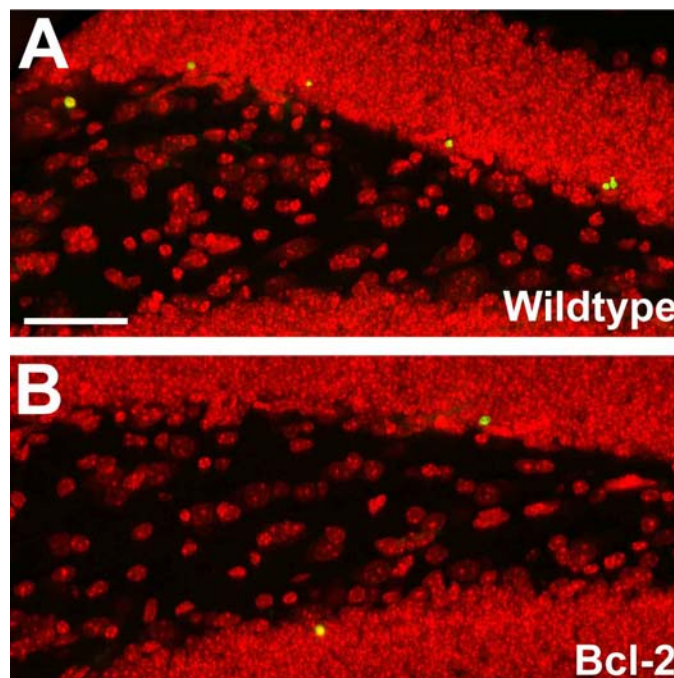


Abb. 38: Im GD von Bcl-2 überexprimierenden Mäusen ist die Anzahl TUNEL-positiver Zellen (grün) gegenüber Wildtyp-Mäusen deutlich reduziert (Gegenfärbung mit Propidiumjodid.; Balken: 50 μm).

6.2.4. Neurogeneserate

Immunhistologische Doppelmarkierungen gegen BrdU und einen neuronalen Marker (NeuN) zeigten, dass die prozentuale neuronale Ausdifferenzierung neuer Zellen im Hippocampus beider Versuchsgruppen identisch bei 80 % liegt. Die Tatsache, dass sich in den Bcl-2 überexprimierenden Tieren ein erheblich höherer Anteil der neugebildeten Zellen etablieren kann, führt folglich zu einer erhöhten Anzahl neuer Nervenzellen. Konnten in der GCL des GD von Wildtyp-Mäusen ($n = 4$) 207 ± 19 (SEM) neugeborene Nervenzellen detektiert werden, so konnten bei transgenen Bcl-2 überexprimierenden Mäusen ($n = 4$) im Schnitt 436 ± 28 solcher Zellen nachgewiesen werden ($p < 0,005$). Aufgrund dieser, um mehr als das Doppelte (111 %) erhöhten Anzahl neuer Nervenzellen, kann man von einer deutlich höheren Neurogeneserate sprechen.

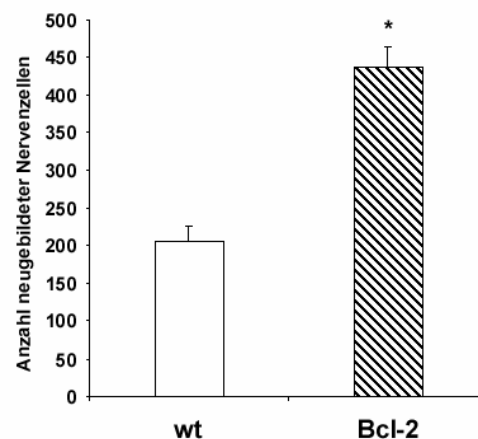


Abb. 39: Bcl-2 überexprimierende Mäuse zeigten insgesamt eine deutlich erhöhte Anzahl neugebildeter Nervenzellen im GD (GCL)



Abb. 40: Neugeborene Nervenzellen (gelb) im GD (GCL) von Wildtyp bzw. Bcl-2 überexprimierenden Mäusen (NeuN: rot; BrdU: grün; Doppelpositive = neugeborene Nervenzelle: gelb/grün; Balken: 50 μ m).

IV. Diskussion

Nachdem das Dogma fehlender Nerven-neubildung im adulten Gehirn gefallen war, beschäftigte sich eine Vielzahl von Studien mit dem Phänomen der adulten Neurogenese. Im Mittelpunkt eines Großteils dieser Studien stand meist der Versuch den Ursprung dieses Phänomens zu finden bzw. eine Förderung der Neurogenese zu bewirken, um sie in der Zukunft therapeutisch nutzen zu können. Weniger beachtet wurde der Aspekt des Schicksals dieser neugebildeten Zellen. Eine Anzahl von Arbeiten beschäftigte sich zwar mit der zellulären Charakterisierung neuer Zellen und deren Etablierung in unterschiedlichen Arealen des Gehirns, doch wurde bei all diesen Arbeiten selten das Schicksal aller neugebildeten Zellen mit einbezogen.

1. Überproduktion neuer Zellen in Zonen adulter Neurogenese

Ausgehend von der Tatsache, dass im adulten Gehirn von Nagetieren eine ständige und umfangreiche Neuproduktion von Nervenzellen stattfindet, besteht die Grundhypothese der vorliegenden Arbeit darin, dass dieser permanenten Proliferation ein Eliminierungsprozess gegenüberstehen muss, um ein übermäßiges Wachstum des Gehirns zu verhindern. Das Augenmerk war in erster Linie auf Strukturen des Gehirns gerichtet, die durch ihre Fähigkeit zur Zellteilung, als Hauptzonen der Neurogenese identifiziert wurden. Dabei handelt es sich um den GD des Hippocampus und das olfaktorische System, das aus SVZ, RMS und BO besteht. Zieht man nun in Betracht, dass es in diesen Zonen eine ständige Neubildung von Zellen gibt, so eröffnen sich unterschiedliche Szenarien bezüglich der daraus resultierenden Folgen. Mögliche Vorstellungen wären sowohl ein lebenslanges Wachstum des Gehirns, als auch ein ständiger Zellersatz. Studien aus den achtziger Jahren, die sich speziell auf diese Regionen konzentrierten, dokumentierten, dass die Granulärzellschichten des GD (Bayer, 1982a; Bayer, 1982b) und des BO (Kaplan, 1985) einem lebenslangen Wachstumsprozess unterliegen. Das Ausmaß dieses Wachstums konnte Bayer durch volumetrische Zellzählungen im GD aufzeigen. Es wurde festgestellt, dass die mittlere Zellzahl der GCL des GD einer 30 Tage alten Ratte 890146 Zellen beträgt. Im Alter von 365 Tagen ist die Zellzahl linear auf 1276734 gestiegen. Dies würde einen Zuwachs von 43 % und eine durchschnittliche tägliche Produktion von 1149 Zellen bedeuten. Ein noch massiveres Wachstum ist in der GCL des BO zu beobachten. Hier konnte Kaplan

(1985) in 3 Monate alten Ratten die Gesamtzahl von ca. 7×10^6 Granulärzellen detektieren. Ratten der gleichen Versuchsreihe zeigten 31 Monate später eine Gesamtzahl von nahezu $1,4 \times 10^7$ Granulärzellen im BO, was eine Verdopplung der Granulärzellen bedeutet. Kaplan errechnete einen Zuwachs von 8800 Zellen täglich bzw. 267000 Zellen monatlich. Er zeigte in dieser Arbeit ebenfalls, dass eine Abnahme der neugebildeten, mit [^3H]-Thymidin markierten Zellen mit der Zeit stattfindet, d.h. er postulierte bereits damals eine Überproduktion an neuen Zellen, welche später eliminiert werden. Leider blieb er in dieser Studie eine genaue Quantifizierung der Proliferation und den Nachweis des Eliminierungsprozesses schuldig.

Ausgehend von diesen Vorlagen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine genaue Quantifizierung der täglichen Produktion an neuen Zellen durchgeführt (Biebl, 2000). So wurden Ratten an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit BrdU injiziert und vier Wochen später perfundiert. Eine quantitative, stereologische Erfassung ergab eine Gesamtzahl von 59159 ± 9946 BrdU-positiven Zellen in der GCL des BO und 1960 ± 310 BrdU-positiven Zellen im GD. Unter der Voraussetzung einer 2stündigen Verfügbarkeit von BrdU im Körper (Phuphanich, 1985; Boswald, 1990) und insgesamt 4 Injektionen kann hieraus eine tägliche Produktion von 177000 Zellen im olfaktorischen System und 5800 Zellen im GD angenommen werden. Setzt man diese tägliche Produktion nun ins Verhältnis mit den bereits vorher beschriebenen Zuwachsraten der untersuchten Strukturen, so ist zu erkennen, dass eine fünffache (GD) bzw. zwanzigfache (BO) Überproduktion an Zellen stattfindet. Sollte dieser Überproduktion kein Eliminierungsprozess gegenüberstehen, würden diese Strukturen innerhalb eines Jahres um ein Vielfaches anwachsen. Eine Hemmung des Eliminierungsprozesses überzählig produzierter Neuronen während der Embryonalentwicklung führte bei Mäusen zu schweren Missbildungen des Gehirns, wie z.B. Deformierungen des Cerebrums und Hyperplasien und endete im Regelfall letal (Kuida, 1996; Kuida, 1998).

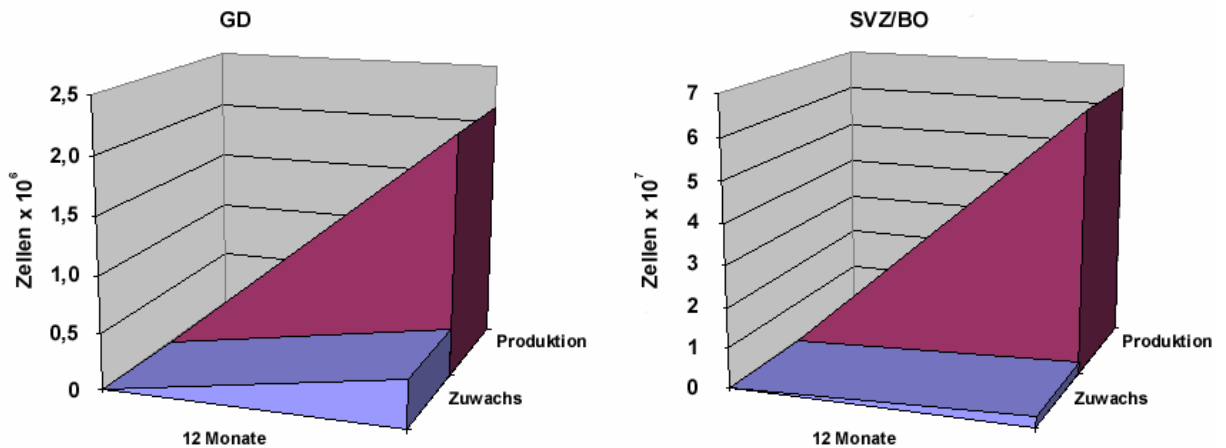


Abb. 41: Vergleich Produktion neuer Zellen und realer Zellzuwachs

Die Produktion neuer Zellen übersteigt den tatsächlichen Zellzuwachs in Zonen der Neurogenese um ein Vielfaches.

2. Apoptose ist ein häufiges Ereignis in Zonen der Neurogenese

Nach dem Beweis einer ständig stattfindenden Überproduktion und der Aufstellung der Hypothese der Existenz einer der Neurogenese gegenläufigen Eliminierung galt es die Natur und vor allem die Art des Eliminierungsprozesses zu untersuchen. Die naheliegendste Vermutung war, dass es sich um eine Form des programmierten Zelltodes, der Apoptose, handelt. Denn zum einen ist Apoptose im gesamten Nervensystems während der Embryonalentwicklung ein häufiges Ereignis und dient dort der Beseitigung der Überproduktion von Nervenzellen (Oppenheim, 1991; Blaschke, 1996; Thomaïdou, 1997; Blaschke, 1998) und zum anderen ist anzunehmen, dass Nekrose, also ein eher inflammatorischer und somit gewebezerstörender Prozess, in einem gesunden Gehirn kein permanent ablaufender, physiologischer Vorgang sein sollte.

Die Beantwortung der Fragestellung, um welche Art der Eliminierung es sich hierbei handelt, wurde mittels unterschiedlicher Nachweisverfahren erbracht. Zunächst wurde versucht, die während der Apoptose stattfindende internukleosomale DNA-Fragmentierung qualitativ nachzuweisen. Bei dieser für *in vitro* Untersuchungen üblichen Methode wird isolierte DNA auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und visualisiert. Da jedoch im adulten Gehirn, verglichen mit einer *in vitro* apoptose-induzierten Zellkultur, eine relativ geringe Dichte an sterbenden Zellen vorhanden ist,

musste eine hochsensitive Methode angewendet werden. Dazu diente die LM-PCR, wobei der Visualisierung der fragmentierten DNA eine Ligation von Primer-Adaptoren und eine Amplifikation mittels PCR vorausgingen. Auf diese Weise konnte eine DNA-Fragmentierung im BO gezeigt werden. Andere Areale des Gehirns, unter anderem Strukturen, die ebenfalls mit Neurogenese in Verbindung stehen, wie Hippocampus, SVZ und RMS zeigten keine DNA-Fragmentierung. Dies ließ darauf schließen, dass der Hauptteil der überschüssigen Zellen im BO eliminiert wird. Eine Aussage, ob es sich bei den eliminierten Zellen um überzählige neuproduzierte oder um ältere etablierte Neurone und somit um einen *Turnover* in der Neuronenpopulation handelt, kann mit diesem Ansatz nicht getroffen werden.

Um eine genaue Lokalisierung und Quantifizierung des nachgewiesenen Zelltodes durchführen zu können, waren histologische Untersuchungen nötig. Eine Standardmethode zum Nachweis von Apoptose ist die sogenannte TUNEL-Färbung. Hierbei wird sich ebenfalls der während des Zelltodes stattfindenden DNA-Fragmentierung bedient. Mittels einer terminalen Transferase werden Biotin-markierte Nukleotide an DNA-Bruchstücke ligiert, die anschließend immunologisch detektiert werden. Eine stereologische Quantifizierung zeigte, dass Apoptose in allen Zonen der Neurogenese ein häufiges Ereignis ist. Als Referenzstruktur diente die GCL des Cerebellums, die eine ähnliche Zelldichte wie die Granulärzellschichten des GD oder des BO besitzt. Ein Vergleich der Anzahl sterbender Zellen pro mm^3 zeigte, dass Areale in denen Neurogenese stattfindet, eine um 20 – 800 fach erhöhte Dichte an apoptotischen Zellen aufweisen. Eine Betrachtung der absoluten Anzahl sterbender Zellen in den unterschiedlichen Strukturen macht auch deutlich, warum es beim qualitativen Nachweis (LM-PCR) der Apoptose nicht in allen Zonen der Neurogenese zu einer positiven Reaktion gekommen ist. Obwohl der Zelltod in all diesen Regionen stark erhöht ist, stehen den im BO 3514 detektierten positiven Zellen 450 im RMS, 204 in der SVZ und 52 im GD gegenüber (Biebl, 2000). Das Fehlen einer DNA-Leiter ist also auf einen caudo-rostralen Gradienten in der Verteilung sterbender Zellen zurückzuführen. So werden ca. 84 % der TUNEL-positiven Zellen im BO gefunden. Die restlichen 16 % sind im RMS (11 %) und in der SVZ (5 %) lokalisiert. Es ist zu vermuten, dass hier selbst die Detektionsgrenze einer so empfindlichen Methode wie der LM-PCR unterschritten wird.

Das Vorhandensein eines Eliminierungsprozesses wurde bereits in früheren Arbeiten in Mäusen untersucht (Morshead, 1992; Morshead, 1998). Die Ergebnisse dieser

Experimente wurden allerdings von den in dieser Arbeit gewonnenen Daten nicht bestätigt. Wurde in den erwähnten Studien die SVZ als Hauptort der Apoptose postuliert, in der 60% der neugebildeten Zellen auch wieder sterben, konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, dass bei Ratten der Hauptort der Zelleliminierung der BO ist. Zelltod ist in der SVZ ein weniger häufiges Ereignis. Ausgehend von den zuvor erwähnten Produktions- und Zuwachsraten liegt die Sterbequote im System BO deutlich höher, nämlich bei ca. 95 %.

Die Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit ermittelten Daten und den früheren Befunden ist auf mehrere Gründe zurückzuführen. Zum einen wurden die Untersuchungen in unterschiedlichen Spezies durchgeführt und zum anderen beschränkte sich Morshead auf eine retrovirale Markierung, sowie auf die Lokalisierung und Quantifizierung der daraus resultierenden Klone. Eine retrovirale Markierung ist üblicherweise eine gängige und potente Methode zum Studium von Zellproliferation und der Beobachtung des Schicksals der neugeborenen Zellen, da theoretisch alle neuen Zellen das inserierte Reportergen enthalten und somit detektierbar sind. Es kommt zu keinerlei Ausdünnungseffekten. Die Tatsache, dass wiederholt beschrieben wurde, dass gerade im zentralen Nervensystem (Schinstine, 1993; Duch, 1994) bzw. in Stammzellen und ihren ausdifferenzierten Abkömmlingen (Challita, 1994; Klug, 2000) ein Verlust der retroviralen Expression beobachtet werden konnte, lassen jedoch die von Morshead erhobenen Daten in einem anderen Licht erscheinen. Man begnügte sich damit das Verschwinden der Proliferationsmarker als Indiz eines stattfindenden Eliminierungsprozesses zu sehen. Den direkten Nachweis sterbender Zellen, der ein Beweis für die Tatsache einer apoptotischen Eliminierung von Zellen gewesen wäre, blieb man allerdings schuldig.

3. Zellzuwachs oder Zellersatz?

Das Vorhandensein von Zellzuwachs wurde schon von Kaplan (1985) und Bayer (1982a,b) beschrieben. Es stellen sich jedoch die Fragen, ob die Produktion von neuen Zellen lediglich diesem Zweck dient, ob es sich bei den sterbenden Zellen um die Eliminierung einer Überproduktion handelt oder ob auch alte etablierte Neuronen sterben, die nun durch neue ersetzt werden.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde versucht, den Nachweis sterbender Zellen mit unterschiedlichen Zellmarkern zu kombinieren. So sollte festgestellt werden, ob es sich

bei den sterbenden Zellen um junge bzw. ausdifferenzierte Neuronen oder Gliazellen handelt. Im Rahmen dieser Versuche konnten keine doppelpositiven Zellen detektiert werden, die für Zellmarker junger Neuronen (β -III-Tubulin), Stamm- bzw. Vorläuferzellen (Nestin) bzw. Gliazellen (GFAP) positiv waren. Lediglich ein sehr geringer Prozentsatz der TUNEL-positiven Zellen war ebenfalls NeuN positiv, d.h. neuronal differenziert. Das Faktum, dass die meisten TUNEL-positiven Zellen mit keinen der verwendeten Zellmarker reagierten, korreliert sehr gut mit anderen Studien, die ein ähnliches Phänomen beschreiben. So ließen sich unter anderem 75 % der apoptotischen Zellen in der SVZ neonataler Ratten keinem Phänotyp zuordnen (Levison, 2000).

In einer kürzlich erschienenen Studie konnte jedoch von unserer Arbeitsgruppe, unter Verwendung eines neu etablierten Zellmarkers für junge, sich ausdifferenzierende Nervenzellen, festgestellt werden (Winner, 2002), dass ein Teil der apoptotischen Zellen im BO positiv reagierten. Bei dem Marker handelt es sich um Doublecortin, ein microtubuli-assoziiertes Protein, das zeitlich begrenzt in migrierenden bzw. sich differenzierenden Neuroblasten exprimiert wird (Francis, 1999; Nacher, 2001). Diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei den eliminierten Zellen zu einem nicht unerheblichen Teil, um die neu produzierten neuronalen Vorläuferzellen handelt, die in den BO eingewandert sind. Die Darstellung des direkten Zusammenhangs durch einen gleichzeitigen quantitativen Nachweis des Proliferationsmarkers BrdU und des Zelltodes ist aus technischen Gründen nicht möglich. Aufgrund des kleinen Zeitfensters beim Nachweis apoptotischer Zellen (2 h) wäre eine exakte zeitliche Abstimmung der BrdU-Injektionen und der Perfusion des Gehirns nötig. Beide Zeitfenster, nämlich BrdU-Markierung und TUNEL-Färbung, lassen sich hierbei jedoch nicht zufriedenstellend in Einklang bringen.

Der Befund allerdings, dass ein Anteil NeuN-positiver also ausdifferenzierter Zellen auch apoptotisch ist, lässt die Annahme zu, dass in geringem Ausmaß ein Zellersatz älterer Neuronen durch neugebildete Nervenzellen im adulten Gehirn stattfindet. Schwierigkeiten bereitet nach wie vor die Tatsache, dass ein Teil der sterbenden Zellen nicht eindeutig charakterisiert werden kann. Eine mögliche Erklärung wäre, dass zu einem Zeitpunkt, an dem eine sterbende Zelle beginnt, ihre DNA zu fragmentieren, auch andere Proteine, mit denen die verwendeten Antikörper potentiell interagieren könnten, bereits in einem derartig hohem Maße degradiert sind, dass keine spezifische Bindung mehr erfolgen kann. Allerdings wurde mehrfach beschrieben, dass eine

quantitative Kombination der TUNEL-Färbung mit einer neuronalen (NeuN) Immunfärbung möglich ist (Araki, 2002; Hu, 2002). Die Ursache ist daher wahrscheinlich auf das Fehlen geeigneter Marker für Stamm- und Vorläuferzellen zurückzuführen. Auf diese Weise konnte die Frage nach der Identität der sterbenden Zellen leider nur unzureichend geklärt werden.

Für das mögliche Vorhandensein eines limitierten Zellersatzes im adulten Gehirn, spricht die Tatsache, dass ein großer Teil der apoptotischen Zellen auch in den Glomeruli des BO zu finden ist. Bei den Glomeruli handelt es sich um eine Akkumulation von Interneuronen, die über die Axone des lateralen olfaktorischen Traktes mit dem olfaktorischen Epithelium in Verbindung stehen (Weiler, 1999). Das olfaktorische Epithelium wiederum ist eine Struktur, die einem ständigen Wechselspiel zwischen Neurogenese und Apoptose unterliegt. Es ist daher vorstellbar, dass das Absterben von Nervenzellen und den damit einhergehenden Verlust des axonalen Zell-Zellkontakts dieser Zellen mit den verbundenen Interneuronen der Glomeruli zu einem Absterben eben dieser und weiteren damit verschalteten Neuronen führt. So könnte zumindest ein Teil der neuen Zellen als Zellersatz dienen. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Unterdrückung olfaktorischer Wahrnehmung in jungen Ratten zu einer massiven Reduktion des BO führt, was jedoch nach Wiederherstellung der Riechfähigkeit regeneriert werden kann (Cummings, 1997). Darüber hinaus führt eine geruchsreiche Umgebung zu einer erhöhten Integration neugebildeter Zellen im BO (Rochefort, 2002). Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Untersuchung, ob eine Läsion des olfaktorischen Epitheliums zu einer Erhöhung der TUNEL-positiven Zellen in einer Region des BO oder der SVZ führt.

Beim Großteil der sterbenden Zellen handelt es sich jedoch wahrscheinlich um neugeborene Zellen, die nach ihrer Wanderung in den Bulbus und ihrer Ausdifferenzierung nicht den nötigen synaptischen Input bzw. Versorgung mit Wachstumsfaktoren oder Neurotrophen erhalten und absterben. Dies ist naheliegend, da dies ein während der Embryonalentwicklung, also einer vergleichbaren Situation, auftretendes Ereignis ist. Es überleben nur Zellen, die in das richtige Milieu einwandern und dort die korrekten synaptischen Verschaltungen eingehen (Oppenheim, 1991). Für diese These sprechen auch zwei kürzlich erschienene Studien (Petreanu, 2002; Winner, 2002). Diesen Studien zufolge verschwindet ein Großteil der BrdU positiven, neugeborenen Zellen in Mäusen bzw. Ratten 2 bis 4 Wochen bzw. 1 bis 3 Monaten nach ihrer Teilung wieder. Danach nimmt die Zahl der mit BrdU markierten Zellen nicht

mehr nennenswert ab. Diese Zeiträume der Reduktion von BrdU-positiven Zellen entsprechen den Zeitspannen, in denen die zelluläre Differenzierung stattfindet. Dies könnte bedeuten, dass alle Zellen absterben, die nicht die richtigen Verbindungen eingehen, wohingegen Zellen, die sich in ihre Umgebung integrieren, langfristig überleben.

4. Caspase 2, Caspase 3 und Caspase 9 spielen eine entscheidende Rolle bei der Apoptose in Zonen der Neurogenese

Nachdem es möglich war eine vermeintliche Verbindung zwischen Neurogenese und Apoptose nachzuweisen, d.h. eine Korrelation zwischen den Orten der Neurogenese und der Zelleliminierung durch Apoptose herzustellen, wurde nach der Möglichkeit gesucht, um in ein potenziell existierendes Gleichgewicht einzugreifen. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob es durch Unterdrückung des Zelltodes zu einem erhöhten Überleben der neugebildeten Zellen und somit zu einer vermehrten Nerven Neubildung kommen kann.

In den letzten Jahren wurde durch eine Vielzahl unterschiedlichster Studien gezeigt, dass embryonaler und induzierter Zelltod im Gehirn durch den Einsatz von Caspase-Inhibitoren reduziert werden kann (Embryonalentwicklung: Milligan, 1995; Ischämie: Cheng, 1998; Chen, 1998; Hara, 1997; Axotomie: Lucius, 1997; Kermer, 1999; Meningitis: Braun, 1999; Transplantation: Schierle, 1999). Die Gabe von Caspase-Inhibitoren nachfolgend auf einen Status epilepticus kann außerdem das Überleben neugeborener Zellen im GD erhöhen (Ekdahl, 2001; Ekdahl, 2002).

Zwar konnten Studien eindeutig eine Involvierung von Caspase 3 in den Eliminierungsprozess überflüssiger Zellen im embryonalen Gehirn nachweisen (Kuida, 1996; Kuida, 1998; Pompeiano, 2000), für eine Beteiligung dieser Caspasen bei der Eliminierung von Zellen im hier untersuchten System der Neurogenese fehlte aber immer noch der Nachweis. In einem ersten Versuch konnte unter Verwendung einer RT-PCR gezeigt werden, dass im Gegensatz zum Cortex im BO eine stark erhöhte Expression von Caspase 2 und 3 vorhanden ist. Caspase 2 wird eigentlich während der frühen Entwicklungsphase des Gehirns exprimiert und ist im adulten Gehirn herabreguliert (Kumar, 1992). Diese deutlich erhöhte Präsenz des Caspase 2 Transkripts unterstreicht deswegen den „embryonalen“ Charakter des Phänomens der Neurogenese. Caspase 9 wurde in beiden untersuchten Strukturen gleich stark exprimiert.

Da dies jedoch noch keinen Aufschluss über die genaue Lokalisierung der Expression der Caspasen gibt, wurde mittels *in situ* Hybridisierungen gezeigt, dass diese stark erhöhte Expression generell in Regionen der Neurogenese stattfindet. Dies gilt sowohl für den BO, als auch für den RMS und den GD des Hippocampus. Lediglich in der SVZ konnte keine erhöhte Expression detektiert werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Großteil der Apoptose außerhalb dieser Region stattfindet und dort eher ein selteneres Phänomen ist. Die erhöhte Expression von Caspase 3 konnte zusätzlich von einer weiteren Arbeitsgruppe (de Bilbao, 1999), ebenfalls durch *in situ* Hybridisierungen, bestätigt werden. Sie fanden hohe Caspase 3 Expressionen im BO und im GD jedoch nicht in der SVZ adulter Mäuse.

Obwohl es Studien gibt, die Hinweise auf eine hohe Korrelation zwischen mRNA Expression und Proteinlevel geben (Gonzalez-Garcia, 1995), ist es trotzdem nicht möglich von einer detektierten erhöhten Expression zweifelsfrei auf eine ebenfalls erhöhte Proteinpräsenz zu schließen. Zum Beweis eines funktionellen Zusammenhangs wurde deshalb versucht, die aktivierte Form der Caspase 3 nachzuweisen. In Ermangelung eines *in situ* verwendbaren rattenspezifischen Antikörpers gegen aktivierte Caspase 3 konnte der direkte immunologische Nachweis nicht erbracht werden. Vergleicht man jedoch auf einem Western Blot unter Verwendung eines Antikörpers gegen aktive Caspase 3 Proteinextraktionen des BO adulter Ratten mit Extraktionen aus anderen Regionen des Gehirns (Cortex), so sind deutlich die Banden der beiden katalytischen Untereinheiten (12 bzw. 17 kDa) zu erkennen. Eine Bande die dem 32 kDa Protein der Procaspase 3 entspricht, war jedoch sowohl im BO als auch im Cortex sichtbar. Einen Hinweis auf die genaue Lokalisierung gibt eventuell die Verteilung Caspase 3 positiver Zellen in der adulten Maus. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der aktivierten Caspase 3-positiven Zellen der Verteilung TUNEL-positiver Zellen entspricht und sich hauptsächlich auf Zonen der adulten Neurogenese beschränkt. All diese Hinweise sprechen deutlich für eine Involvierung von Caspase 2 und 3 in das Phänomen des programmierten Zelltodes in den Hauptregionen der adulten Neurogenese.

Von besonderem Interesse war auch, dass im BO die mRNA Expression beider bekannten Splicevarianten der Caspase 2 (Ich-1_L und Ich-1_S) nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz zum Lymphgewebe oder den Ovarien, in denen Ich-1_L das vorherrschende Ich-1 Transkript ist, werden im Gehirn beide Produkte gleichwertig exprimiert (Wang, 1994; Bergeron, 1998; Jiang, 1998). Funktionelle *in vitro* Analysen

zeigten, dass die beiden Proteinvarianten unterschiedliche Effekte bedingen. Überexpression von Ich-1_L verursachte Apoptose in Säugetierzellen. Im Gegensatz dazu verhindert die Expression von Ich-1_S, nach Induktion von Apoptose mittels Serum Entzug, programmierten Zelltod in Rat-1 Zellen (Wang, 1994). Ich-1_L und Ich-1_S sind ein Beispiel für funktionell antagonistische Proteine, die durch unterschiedliches Splicing generiert werden. Diese Ergebnisse und die Erkenntnis, dass der BO, ebenso wie das embryonale Gehirn, beide Splicevarianten exprimiert, lassen die Folgerung zu, dass Caspase 2 eine wichtige regulatorische Rolle bei der Apoptose neuronaler Zellen bzw. deren Vorläuferzellen im adulten Gehirn spielt.

5. Injektion eines Caspase-Inhibitors führt zu deutlicher Senkung der Apoptoserate in Zonen der Neurogenese

Nach dem Nachweis, dass im adulten Nagergehirn Neurogenese stets einhergeht mit Apoptose unter der Beteiligung von Caspase 3 und Caspase 2, wurde im Rahmen weitergehender Experimente versucht, an diesem Punkt exogen in dieses Verhältnis einzugreifen. Unterschiedliche Gruppen applizierten bereits Inhibitoren der Caspasen 1 (Z-YVAD-FMK) und 3 (Z-DEVD-FMK) bzw. generelle Caspasen-Inhibitoren (Boc-Aspartyl[OMe]Fluoromethylketon = B-D-FMK = BAF), um embryonalen bzw. induzierten Zelltod zu reduzieren (vgl. Kapitel IV. 4.).

Zur Analyse des Einflusses einer Apoptosehemmung in Zonen der adulten Neurogenese wurde BAF als zu applizierende Substanz gewählt. Dabei handelt es sich um einen zellpermeablen, irreversiblen Inhibitor, der nicht spezifisch gegen eine bestimmte Caspase wirkt, sondern die Aktivität aller 14 bisher bekannten Caspasen unterdrückt. *In vitro* Studien zeigten, dass BAF in Neuronen einen durch Entzug des trophischen Faktors NGF (Deshmukh, 1996) oder hypoxisch induzierten apoptotischen Zelltod (Cheng, 1999) über einen Zeitraum von mehreren Stunden blockieren kann. Es konnten auch Neurone, die aufgrund von Mangel an $[K^+]$ -Ionen apoptotisch wurden, mit BAF gerettet werden, wohingegen Z-DEVD-FMK, ein Caspase 3-Inhibitor, in diesem Fall den Zelltod nicht verhindern konnte (Lynch, 1997). BAF wurde auch schon *in vivo* erfolgreich eingesetzt (Cheng, 1998). In neonatalen Ratten konnte eine intraventrikuläre Injektion des Inhibitors, folgend auf eine hypoxische Ischämie (Modell unilateraler Ischämie kombiniert mit anschließender Hypoxie nach Rice, 1981), einen stark neuroprotektiven Effekt erzielen. Des Weiteren zeigten Caspase-Inhibitoren in

Zellkulturversuchen eine deutlich geringere Toxizität als andere Protease-Inhibitoren, wie z.B. Calpeptin, Calpain Inhibitor 1 oder Leupeptin (Monti, 1998). Aus den hier aufgeführten Gründen und dem Nachweis, dass mehrere Caspasen an der Zelleliminierung im untersuchten System beteiligt sind, wurde BAF als der am besten geeignete Inhibitor ausgewählt.

Von einer peripheren Applikation des Inhibitors wurde abgesehen, da die Blut-Hirn-Schranke für diesen unpassierbar ist. Folglich musste ein Weg zur lokalen, intraventrikulären Verabreichung gewählt werden. Da BAF nur eine geringe Halbwertszeit (24 h bei 37°C) aufweist, wurde anstatt einer permanent Inhibitor zuführenden osmotischen Pumpe, eine Führungskanüle implantiert, durch die eine Woche lang täglich BAF direkt in den Seitenventrikel injiziert werden konnte. Die Tiere wurden 24 h nach der letzten Injektion perfundiert und analysiert. Zur Quantifizierung des Zelltodes wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt und stereologisch ausgewertet. Es konnte in allen neurogenen Bereichen eine drastische Reduktion des Zelltodes detektiert werden. Im GD wurde die Zahl der TUNEL-positiven Zellen um 61 % gesenkt. In der SVZ (59 %) und dem BO (EPL: 46 %; GL: 54 %; GCL: 48 %) wurden ähnliche Resultate detektiert. Die nachgewiesenen Werte korrelieren sehr gut mit dem zu erwartenden Ergebnis, das auf einer Studie von Cheng et al. (1998) beruht. In dieser Studie konnte durch Gabe von BAF der Gewebeverlust in Ratten nach hypoxischer Ischämie im Hippocampus, im Striatum und im Cortex um mehr als 50 % reduziert werden.

Trotz allem sollte die in der hier dargestellten Studie nachgewiesene Reduktion des Zelltodes in der SVZ kritisch betrachtet werden. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Regionen ist in der SVZ der Kontrollgruppe die Anzahl sterbender Zellen gegenüber früheren Quantifizierungen massiv erhöht. Diese Erhöhung ist wahrscheinlich auf die Implantation der Führungskanülen zurückzuführen. Dies würde bedeuten, dass zwar die Reduktion des Zelltodes real ist, aber es sich nicht um natürlich vorkommende Apoptose handelt, sondern um die Reduktion des durch die Operation verursachten läsional induzierten Zelltodes.

Diskutabel bleibt, ob es sich bei dieser Reduktion des Zelltodes um einen Langzeiteffekt handelt. So konnte in der Studie von Morshead (2000), die in adulten CD1-Mäusen durchgeführt wurde, gezeigt werden, dass Zellen, die durch intraventrikuläre Applikation des *cell survival factors* N-Acetyl-L-Cystein (NAC) vom programmierten Zelltod abgehalten wurden, nach Beendigung der Behandlung dennoch innerhalb von 6

Tagen eliminiert wurden. Es konnte ebenso gezeigt werden, dass in diesen Mäusen, während der Behandlungsdauer die Anzahl neugeborener, BrdU-positiver Zellen in der SVZ erhöht war. Da NAC nicht proliferationsstimulierend wirkt, muss es sich hier um einen Überlebensseffekt handeln. Dies deutet darauf hin, dass der Ort der Zelleliminierung in der Maus unterschiedlich ist, verglichen zu der in Ratten. Stirbt in der Ratte ein Großteil der Zellen im BO, müsste sich dies nach der Studie von Morshead (2000) bei Mäusen verstärkt, in der SVZ abspielen. Ansonsten ließe sich die nicht-proliferative Zunahme von BrdU-positiven Zellen dort nicht erklären. Dies wird durch die Beobachtung einer erhöhten Zahl an TUNEL-positiven Zellen in der SVZ von Mäusen im Verhältnis zum BO bestärkt (mündliche Mitteilung Georg Kuhn).

Im Rahmen dieses Experiments sollte zusätzlich festgestellt werden, ob ein erhöhtes Überleben der neugeborenen Zellen erreicht werden kann. Die Tiere erhielten aus diesem Grund parallel zu den Inhibitor-Injektionen BrdU gespritzt. Zusätzlich wurden Tiere analysiert, die 4 Wochen nach den letzten Injektionen perfundiert wurden und somit einen potentiellen Langzeiteffekt aufzeigen sollten. Es konnten jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt werden. Die Zahl der BrdU-positiven Zellen zeigte weder 24 h noch 4 Wochen nach den letzten Injektionen einen signifikanten Unterschied. Dies bedeutet zumindest, dass die Injektion des Inhibitors keinerlei Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Tiere ausübt. Man sollte aus diesen Ergebnissen jedoch nicht den Schluss ziehen, dass kein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern besteht. Vielmehr liegt der Grund für die fehlende Signifikanz mit hoher Wahrscheinlichkeit in der falschen Auswahl der Injektions- bzw. Perfusionszeitpunkte. Wie aktuelle Langzeitstudien dokumentieren (Winner, 2002) beginnt die Hauptwelle der Zelleliminierung nicht, wie von unserer Arbeitsgruppe angenommen, unmittelbar nach der Teilung der Zellen bzw. in den darauffolgenden Tagen, sondern erfolgt erst 1 – 3 Monate später. Dies würde bedeuten dass beide untersuchten Zeitpunkte vor der eigentlichen Apoptosewelle liegen und deshalb aus der Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen kein Rückschluss auf die Förderung des Überlebens neugebildeter Zellen gezogen werden darf. Vielmehr müsste, um eine quantitative Aussage über die Förderung von Langzeitüberleben neugebildeter Neurone machen zu können, die Inhibitor-Injektionen zwischen dem 2. und 3. Monat nach der Gabe von BrdU erfolgen. Dies scheint der kritische Zeitraum zu sein, in dem auch die Integration der neuen Zellen stattfindet.

6. Analyse Bcl-2 überexprimierender Mäuse zeigt erhöhtes Überleben neugeborener Zellen im Hippocampus

Zur Analyse einer endogenen Einflussnahme auf ein potentielles Gleichgewicht zwischen Zelltod und Proliferation wurde ein Bcl-2 überexprimierendes Mausmodell verwendet (Martinou, 1994). Das Protoonkogen *bcl-2* codiert ein membran-assoziiertes Protein, das in verschiedenen Modellen eine anti-apoptotische Wirkung aufweist (Reed, 1994). Das Protein wird natürlicherweise in den meisten Neuronen exprimiert und zeigte die höchsten Expressionsniveaus in proliferativen Zellen der ventrikulären Zonen und in postmitotischen Neuronen während des natürlich auftretenden Zelltodes (LeBrun, 1993; Merry, 1994). *In vitro* Experimente konnten außerdem belegen, dass Bcl-2 in Neuronen, in denen durch den Entzug neurotropher Faktoren (z.B. NGF, BDNF oder NT-3) Apoptose induziert wurde, den Zelltod verhindern konnte (Garcia, 1992; Mah, 1993, Allsopp, 1993).

Eine transgene Überexpression von Bcl-2 führte zu einer Reduktion des natürlich vorkommenden Zelltodes während der Embryonalentwicklung und somit zu einer erhöhten Population (ca. 40%) unterschiedlichster Neurone, wie z.B. Purkinje Zellen, facialen Motoneuronen oder retinalen Ganglionzellen (Garcia, 1992; Martinou, 1994; Farlie, 1995; Zanjani, 1996; Zanjani, 1997). Ebenso konnte in diesen Tieren ein erhöhtes Überleben von Nervenzellen nach einer experimentellen Ischämie nachgewiesen werden. Die transgenen Tiere zeigten ein um 43 % reduziertes Volumen des ischämischen Infarkts (Martinou, 1994).

Im hier verwendeten Modell erfolgte die Expression des *bcl-2* Gens unter der Kontrolle des NSE (*neuron-specific enolase*) Promotors. Dieser ist in der Lage heterologe Gene in postmitotischen Neuronen und neuroendokrinen Zellen zu exprimieren (Forss-Petter, 1990). In *in vitro* Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der NSE Promotor eine transkriptionale Aktivität in murinen, embryonalen Stammzellen aufweist (Alouani, 1993) und somit potentiell auch in neuronalen Vorläuferzellen aktiv sein sollte. In den bei der vorliegenden Forschungsarbeit verwendeten Mäusen konnte bereits während der Embryonalentwicklung (ab E13) eine Expression in postmitotischen Neuronen nachgewiesen werden (Martinou, 1994). Das adulte Gehirn zeigte in vielen Regionen, unter anderem in den hier untersuchten Hauptregionen der adulten Neurogenese, eine deutlich erhöhte Expression von Bcl-2.

Eine quantitative, stereologische Analyse der Granulärzellschichten des GD, sowie des BO ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an Granulärzellen im GD. Die Zellzahl war gegenüber den Kontrolltieren um 17 % erhöht. Im BO ließ sich zwar ein ähnlicher Wert feststellen (18 % Erhöhung gegenüber den Kontrolltieren), dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Dies könnte auf ein erhöhtes Überleben neugebildeter Zellen hindeuten, lässt aber auch den Schluss zu, dass bereits während der Frühphase der Embryonalentwicklung eine erhöhte Anzahl an neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen überlebt haben. Dies nachzuweisen, ist zum momentanen Stand nicht möglich, da die Identität dieser Stamm- und Vorläuferzellen bis heute umstritten ist. So wurden in einer Reihe von Studien bis jetzt Ependymalzellen (Johansson, 1999), subependymale Zellen (Chiasson, 1999), sowie Astrocyten (Doetsch, 1999) als adulte neuronale Stammzellen identifiziert. Neuere Studien scheinen die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass es sich bei den proliferativen, multipotenten Zellen in der SVZ um eine Unterpopulation von subependymale Astrozyten handelt (Laywell, 2000). Eine endgültige Klärung in dieser Frage ist allerdings noch abzuwarten. Für eine erhöhte Anzahl an Stamm- bzw. Vorläuferzellen spricht jedoch die Tatsache, dass in den transgenen Tieren in der SVZ eine um 42 % erhöhte Proliferation nachgewiesen wurde. Es ist anzunehmen, dass sich innerhalb eines so kurzen Zeitraums kein sogenannter Überlebenseffekt durch reduzierten Zelltod einstellen kann. Die ebenfalls hier nachgewiesene, jedoch statistisch nicht signifikante Vergrößerung des Volumens der SVZ (20 %), unterstreicht wiederum die Vermutung einer erhöhten Anzahl an Stamm- und Vorläuferzellen. Untersucht man nun die Anzahl BrdU-positiver Zellen nach 4 Wochen, so kann überraschenderweise festgestellt werden, dass im BO (wohin die neugeborenen Zellen mittlerweile migriert sind) keine Erhöhung an neugebildeten Zellen nachweisbar ist. Dies würde bedeuten, dass die 4 Wochen zuvor detektierten BrdU-positiven Zellen einen nicht unerheblichen Eliminierungsprozess durchlaufen sein müssen.

Im Gegensatz hierzu konnte im GD, der keine signifikante Erhöhung der Proliferation aufwies, ein massiver Überlebenseffekt detektiert werden. So wurde in den transgenen Tieren 4 Wochen nach der letzten BrdU-Injektion eine um 108 % erhöhte Anzahl an BrdU-positiven Zellen nachgewiesen. Dies bedeutet, dass im GD, gegensätzlich zum BO, eindeutig ein Überlebenseffekt eintrat. TUNEL-Färbungen zeigten, dass dieser protektive Effekt auf eine Reduktion des Zelltodes um ca. 55 % zurückzuführen ist. Eine quantitative Auswertung einer Immundoppelfärbung gegen den

Proliferationsmarker BrdU und einem neuronalen Marker zeigte einen identischen prozentualen Anteil an Neuronen unter den neugebildeten Zellen. In beiden Versuchsgruppen entwickelten sich 80 % der BrdU-positiven Zellen zu Nervenzellen. Dies berechtigt die Aussage, dass in Bcl-2 transgenen Mäusen aufgrund der 2fach erhöhten Überlebensrate neuer Zellen eine um das Doppelte gesteigerte Neurogeneserate vorliegt. Die Frage, warum sich die Neurogeneserate im BO nicht beeinflussen ließ, lässt sich in diesem Zusammenhang nicht beantworten. Fakt ist jedoch, dass auch in früheren Studien immer wieder Unterschiede im Proliferations- und Differenzierungsverhalten in den verschiedenen Regionen der Neurogenese zu beobachten waren. So zeigten beispielsweise EGF und FGF-2 deutlich einen Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten in der SVZ bzw. im BO, wohingegen hippocampale Vorläuferzellen durch beide Faktoren nicht beeinflusst wurden (Kuhn, 1997).

Nun stellt sich die Frage, ob diese Steigerung der Neurogeneserate in einer Struktur, die in Zusammenhang mit Lernfähigkeit und Erinnerung steht, sich positiv auf bestimmte Verhaltensweisen auswirken kann. Dies konnte bis jetzt allerdings nicht nachgewiesen werden. Gegenteilig zu dieser Annahme schnitten Bcl-2 überexprimierende Mäuse in Verhaltenstests, in denen Lernfähigkeit und Erinnerung untersucht wurden, sogar deutlich schlechter ab als Wildtyp-Tiere (Rondi-Reig, 2001). Mehr Neurone sind also nicht immer automatisch funktionell verbessernd, aber es ist wahrscheinlich noch zu früh um hippocampale Neurogenese und hippocampale Funktion in Relation setzen zu können. Bevor dies jedoch möglich wird, muss noch eine Vielzahl anderer potentieller Einflussfaktoren identifiziert und untersucht werden. Dies kann als Aufgabe kommender Forschungsprojekte angesehen werden. Die hier vorliegende Arbeit versteht sich als Basis, auf der weiterführende Studien zum Verständnis dieser hochkomplexen Systeme aufbauen sollen. Erstrebenswert wäre jedenfalls die Möglichkeit, das körpereigene Regenerationspotential der Neurogenese zukünftig therapeutisch nutzbar machen zu können.

V. Zusammenfassung

Nach der Widerlegung der Lehrmeinung, dass im Gehirn von adulten Säugetieren keine Nerven-neubildung stattfindet, wurde eine Vielzahl empirischer und molekularbiologischer Studien zur genaueren Charakterisierung dieses Phänomens durchgeführt. In diesen Studien konnten unter anderem die Hauptregionen der adulten Neurogenese (Gyrus dentatus des Hippocampus und das olfaktorische System, bestehend aus subventrikulärer Zone, rostralem, migratorischem Strom und Bulbus olfactorius) bzw. Möglichkeiten ihrer Modulation identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte basierend auf stereologischen Quantifizierungen dokumentiert werden, dass im adulten Rattengehirn eine permanente, massive Überproduktion an neugeborenen Zellen stattfindet. Diese Überproduktion zieht den Schluss nach sich, dass dieser ein Eliminierungsprozess gegenüberstehen muss, um unkontrolliertes Wachstum und damit einhergehende Folgeschäden im Gehirn zu vermeiden. Das Vorhandensein eines solchen apoptotischen Prozesses konnte nachgewiesen werden. Mittels molekularbiologischer und immunhistologischer Methoden konnte bestätigt werden, dass gerade in den Hauptregionen adulter Neurogenese eine je nach Struktur um bis zu 800fach erhöhte Apoptoserate vorhanden ist. Die Identität all dieser sterbenden Zellen konnte mangels eines geeigneten Zellmarkers nicht eindeutig geklärt werden, doch handelt es sich wahrscheinlich zum Großteil um die Eliminierung der überzählig neu produzierten Zellen. Ein Anteil der apoptotischen Zellen ließ sich aber auch als reife Neuronen identifizieren, was die Möglichkeit eines potentiellen Zellersatzes nahe legt. Dieser Zellersatz wäre vor allem im olfaktorischen System denkbar, da es hier permanent zu neuen neuronalen Neuerschaltungen kommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls versucht die Absterberate der neuproduzierten Zellen zu beeinflussen. Nachdem eindeutig die Beteiligung der Caspasen 2 und 3 nachgewiesen werden konnte, war es naheliegend einen Caspase-Inhibitor zu verwenden, um ein potentielles Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose zu modulieren. Die intraventrikuläre Injektion des allgemeinen Caspase-Inhibitors BAF führte zu einer drastischen Reduktion des Zelltods in allen untersuchten Regionen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Proliferationsrate. Auch ließen sich

keine Rückschlüsse auf ein erhöhtes Überleben der neugebildeten Zellen ziehen, da hierfür eine genaue zeitliche Abstimmung der Injektion von Proliferationsmarker und Apoptose-Inhibitor gefunden werden muss. Zur Umgehung dieses Problems und zur Untersuchung endogener Modulation des Zelltods wurden ähnliche Quantifizierungen in Gehirnen transgener, Bcl-2 überexprimierenden Mäusen durchgeführt. Hierbei konnte unter anderem festgestellt werden, dass im Hippocampus dieser Mäuse, jedoch nicht im olfaktorischen System, ein massiver Überlebenseffekt präsent ist. Dies geht einher mit der Tatsache, dass diese Mäuse auch einen statistisch signifikant vergrößerten Gyrus dentatus haben.

Die gewonnenen Erkenntnisse ermöglichen, das Phänomen der adulten Neurogenese besser zu verstehen und sollen darüber hinaus einen Beitrag dazu leisten, zukünftig das endogene Potential der Nerven Neubildung soweit modulieren zu können, um es bei neuroregenerativen Prozessen nutzbringend einzusetzen.

VI. Literaturverzeichnis

- Åberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS:** Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000 Apr 15;20(8):2896-903.
- Adams JM, Cory S:** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.
- Allen E:** The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* 1912 19:547-68.
- Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM:** The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993 Apr 23;73(2):295-307.
- Alouani S, Ketchum S, Rambosson C, Eistetter HR:** Transcriptional activity of the neuron-specific enolase (NSE) promoter in murine embryonic stem (ES) cells and preimplantation embryos. *Eur J Cell Biol* 1993 Dec;62(2):324-32.
- Altman J:** Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 1962 135:1127-8.
- Altman J:** Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. Postnatal growth and differentiation of the mammalian brain, with implications for a morphological theory of memory. *Anat Rec* 1963 145:573-1.
- Altman J, Das GD:** Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965 124:319-35.

- Altman J, Das GD:** Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 1966 126:337-390.
- Altman J:** Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969 137:433-58.
- Araki T, Simon RP, Taki W, Lan JQ, Henshall DC:** Characterization of neuronal death induced by focally evoked limbic seizures in the C57BL/6 mouse. *J Neurosci Res* 2002 Sep 1;69(5):614-21.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K:** Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York 1999.
- Bayer SA:** Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp Brain Res* 1982a;46(3):315-23.
- Bayer SA, Yackel JW, Puri PS:** Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 1982b May 21;216(4548):890-2.
- Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J:** Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev* 1998 May 1;12(9):1304-14.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A:** Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Aug 20;99(17):11464-9.

- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG:** Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 2000 Sep 8;291(1):17-20.
- Blaschke AJ, Staley K, Chun J:** Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development* 1996 Apr;122(4):1165-74.
- Blaschke AJ, Weiner JA, Chun J:** Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *J Comp Neurol* 1998 Jun 22;396(1):39-50.
- Borner C:** The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003 39:615-47.
- Boswald M, Harasim S, Maurer-Schultze B:** Tracer dose and availability time of thymidine and bromodeoxyuridine: application of bromodeoxyuridine in cell kinetic studies. *Cell Tissue Kinet* 1990 May;23(3):169-81.
- Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI:** Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 1999 Mar;5(3):298-302.
- Calof AL, Hagiwara N, Holcomb JD, Mumm JS, Shou J:** Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. *J Neurobiol* 1996 May;30(1):67-81.
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E:** Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 1995 Jun;15(6):4687-92.
- Cameron HA, Tanapat P, Gould E:** Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 1998 Jan;82(2):349-54.

- Cande C, Cecconi F, Dessen P, Kroemer G:** Apoptosis-inducing factor (AIF): key to the conserved caspase-independent pathways of cell death? *J Cell Sci* 2002 Dec 15;115(Pt24): 4727-34.
- Challita PM, Kohn DB:** Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Mar 29;91(7):2567-71.
- Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP:** Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998 Jul 1;18(13):4914-28.
- Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, Holtzman DM:** Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998 May 1;101(9):1992-9.
- Cheng AG, Huang T, Stracher A, Kim A, Liu W, Malgrange B, Lefebvre PP, Schulman A, Van de Water TR:** Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res* 1999 Dec 11;850(1-2):234-43.
- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D:** Adult mammalian fore-brain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 1999 Jun 1;19(11):4462-71.
- Corotto FS, Henegar JR, Maruniak JA:** Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience* 1994 Aug;61(4):739-44.
- Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D:** *In vivo* growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 1996 16:2649-2658.

- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS:** Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 2002 Aug 5;158 (3):507-17.
- Cummings DM, Henning HE, Brunjes PC:** Olfactory bulb recovery after early sensory deprivation. *J Neurosci* 1997 Oct 1;17(19):7433-40.
- Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G:** Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters* 2000 476:118-23.
- de Bilbao F, Guarin E, Nef P, Vallet P, Giannakopoulos P, Dubois-Dauphin M:** Postnatal distribution of cyp32/caspase 3 mRNA in the mouse central nervous system: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 1999 Jul 5;409(3):339-57.
- Deshmukh M, Vasilakos J, Deckwerth TL, Lampe PA, Shivers BD, Johnson EM Jr:** Genetic and metabolic status of NGF-deprived sympathetic neurons saved by an inhibitor of ICE family proteases. *J Cell Biol* 1996 Dec;135(5):1341-54.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A:** Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 1997 Jul 1;17(13):5046-61.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A:** Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999 Jun 11;97(6):703-16.
- Duch M, Paludan K, Jorgensen P, Pedersen FS:** Lack of correlation between basal expression levels and susceptibility to transcriptional shutdown among single-gene murine leukemia virus vector proviruses. *J Virol* 1994 Sep;68(9):5596-601.

- Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH:** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
- Ekdahl CT, Mohapel P, Elmer E, Lindvall O:** Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitor-cell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *Eur J Neurosci* 2001 Sep;14(6):937-45.
- Ekdahl CT, Mohapel P, Weber E, Bahr B, Blomgren K, Lindvall O:** Caspase-mediated death of newly formed neurons in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *Eur J Neurosci* 2002 Oct;16(8):1463-71.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH:** Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998 Nov;4(11):1313-7.
- Farlie PG, Dringen R, Rees SM, Kannourakis G, Bernard O:** bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 9;92(10):4397-401.
- Forss-Petter S, Danielson PE, Catsicas S, Battenberg E, Price J, Nerenberg M, Sutcliffe JG:** Transgenic mice expressing beta-galactosidase in mature neurons under neuron-specific enolase promoter control. *Neuron* 1990 Aug;5(2):187-97.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J:** Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 1999 Jun;23(2):247-56.
- Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J:** Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Dec 5;92(25):11879-83.

Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J: Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J Neurobiol* 1998 Aug;36(2):249-66.

Gage FH: Mammalian neural stem cells. *Science* 2000 Feb 25;287(5457):1433-8.

Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC: Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992 Oct 9;258(5080):302-4.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992 Nov;119(3):493-501.

Goldman SA, Nottebohm F: Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Apr;80(8):2390-4.

Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, Nunez G: bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 May 9;92(10):4304-8.

Gottlieb RA: Mitochondria: execution central. *FEBS Letters* 2000 482:6-12.

Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS: Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 1992 Sep;12(9):3642-50.

Gould E: The effects of adrenal steroids and excitatory input on neuronal birth and survival. *Ann N Y Acad Sci* 1994 Nov 14;743:73-92; discussion 92-3.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation *J Neurosci* 1997 Apr 1;17(7):2492-8.

- Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E:** Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999a Apr 27;96(9):5263-7.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG:** Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 1999b Oct 15;286(5439):548-52.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ:** Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 1999c Mar;2(3):260-5.
- Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA:** Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Mar 4;94(5):2007-12.
- Harzsch S, Miller J, Benton J, Beltz B:** From embryo to adult: persistent neurogenesis and apoptotic cell death shape the lobster deutocerebrum. *J Neurosci* 1999 May 1;19(9):3472-85.
- Hengartner MO:** The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
- His W:** Die Entwicklung des menschlichen Gehirns. Hirzel, Leipzig 1904.
- Hu X, Johansson IM, Brannstrom T, Olsson T, Wester P:** Long-lasting neuronal apoptotic cell death in regions with severe ischemia after photothrombotic ring stroke in rats. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002 Nov;104(5):462-70.
- Jiang ZH, Zhang WJ, Rao Y, Wu JY:** Regulation of Ich-1 pre-mRNA alternative splicing and apoptosis by mammalian splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Aug 4;95(16):9155-60.
- Johansson CB, Momba S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J:** Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999 Jan 8;96(1):25-34.

- Kaplan MS, Hinds JW:** Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 1977 Sep 9;197(4308):1092-4.
- Kaplan MS, McNelly NA, Hinds JW: Population** dynamics of adult-formed granule neurons of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1985 Sep 1;239(1):117-25.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH:** More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 1997a Apr 3;386(6624):493-5.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH:** Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997b Sep 16;94(19):10409-14.
- Kempermann G, Gage FH:** Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci* 2002 Jul;16(1):129-36.
- Kermer P, Klocker N, Bahr M:** Long-term effect of inhibition of ced 3-like caspases on the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Exp Neurol* 1999 Jul;158(1):202-5.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR:** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-57.
- Klug CA, Cheshier S, Weissman IL:** Inactivation of a GFP retrovirus occurs at multiple levels in long-term repopulating stem cells and their differentiated progeny. *Blood* 2000 Aug 1;96(3):894-901.
- Koelliker A:** Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Engelmann, Leipzig 1896.
- Kornack DR, Rakic P:** Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 May 11;96(10):5768-73.
- Krammer PH:** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000 Oct 12;407:789-95.

- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH:** Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996 Mar 15;16(6):2027-33.
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH:** Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 1997 Aug 1;17(15):5820-9.
- Kuhn HG, Svendsen CN:** Origins, functions, and potential of adult neural stem cells. *Bioessays* 1999 Aug;21(8):625-30.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA:** Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996 Nov 28;384(6607):368-72.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA:** Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998 Aug 7;94(3):325-37.
- Kumar S, Tomooka Y, Noda M:** Identification of a set of genes with developmental down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 185:1155-61.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA:** Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Dec 5;97(25):13883-8.
- LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML:** Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol* 1993 Mar;142(3):743-53.
- Lee J, Seroogy KB, Mattson MP:** Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 2002 Feb;80(3):539-47.

Levi G: Sulla cariocinesi delle cellule nervose. Riv Patol Nerv Ment 1898 3:97-113.

Levison SW, Rothstein RP, Brazel CY, Young GM, Albrecht PJ: Selective apoptosis within the rat subependymal zone: a plausible mechanism for determining which lineages develop from neural stem cells. Dev Neurosci 2000;22(1-2):106-15.

Li LY, Luo X, Wang X: Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature 2001 Jul 5;412(6842):95-9.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 1997 Nov 14;91(4):479-89.

Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR: Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. J Neurosci 1998 Oct 1;18(19):7768-78.

Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Chain migration of neuronal precursors. Science 1996 Feb 16;271(5251):978-81.

Lucius R, Sievers J: YVAD protect post-natal retinal ganglion cells against axotomy-induced but not free radical-induced axonal degeneration in vitro. Brain Res Mol Brain Res 1997 Aug;48(1):181-4.

Lynch T, Vasilakos JP, Raser K, Keane KM, Shivers BD: Inhibition of the interleukin-1 beta converting enzyme family rescues neurons from apoptotic death. Mol Psychiatry 1997 May;2(3):227-38.

Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD: Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature 2000 Jun 22;405(6789):951-5.

Mah SP, Zhong LT, Liu Y, Roghani A, Edwards RH, Bredesen DE: The protooncogene bcl-2 inhibits apoptosis in PC12 cells. J Neurochem 1993 Mar;60(3):1183-6.

- Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, Missotten M, Albertini P, Talabot D, Catsicas S, Pietra C:** Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994 Oct;13(4):1017-30.
- Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ:** bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development* 1994 Feb;120(2):301-11.
- Milligan CE, Prevette D, Yaginuma H, Homma S, Cardwell C, Fritz LC, Tomaselli KJ, Oppenheim RW, Schwartz LM:** Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and in vitro. *Neuron* 1995 Aug;15(2):385-93.
- Monti B, Sparapani M, Contestabile A:** Differential toxicity of protease inhibitors in cultures of cerebellar granule neurons. *Exp Neurol* 1998 Oct;153(2):335-41.
- Morshead CM, van der Kooy D:** Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* 1992 Jan;12(1):249-56.
- Morshead CM, Craig CG, van der Kooy D:** In vivo clonal analyses reveal the properties of endogenous neural stem cell proliferation in the adult mammalian forebrain. *Development* 1998 Jun;125(12):2251-61.
- Morshead CM, van der Kooy D:** A cell-survival factor (N-acetyl-L-cysteine) alters the in vivo fate of constitutively proliferating subependymal cells in the adult forebrain. *J Neurobiol* 2000 Feb 15;42(3):338-46.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, Nettesheim D, Chang BS, Thompson CB, Wong SL, Ng SL, Fesik SW:** X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996 May 23;381(6580):335-41.

- Nacher J, Crespo C, McEwen BS:** Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 2001 Aug;14(4):629-44.
- Nagata S:** Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000 Apr 10;256(1):12-8.
- Nakaya M, Masuda Y, Mihara S, Aiuchi T, Shibayama-Imazu T, Nakajo S, Nakaya K:** Analysis of caspases that are activated during apoptosis in leukemia U937 cells in response to geranylgeraniol. *Anticancer Res* 1999 Nov-Dec;19(6B):5063-8.
- Oppenheim RW:** Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991;14:453-501.
- Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevet D, Kuan CY, Rakic P:** Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci* 2001 Jul 1;21(13):4752-60.
- Palmer TD, Ray J, Gage FH:** FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 1995 Oct;6(5):474-86.
- Palmer TD, Markakis EA, Willhoite AR, Safar F, Gage FH:** Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J Neurosci* 1999 Oct 1;19(19):8487-97.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH:** Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997 May 15;17(10):3727-38.
- Paxinos G, Watson C:** The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth edition. Academic press 1998.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A:** Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci* 2002 Jul 15;22(14):6106-13.

- Phuphanich S, Levin VA:** Bioavailability of bromodeoxyuridine in dogs and toxicity in rats. *Cancer Res* 1985 May;45(5):2387-9.
- Pompeiano M, Blaschke AJ, Flavell RA, Srinivasan A, Chun J:** Decreased apoptosis in proliferative and postmitotic regions of the Caspase 3-deficient embryonic central nervous system. *J Comp Neurol* 2000 Jul 17;423(1):1-12.
- Ramón y Cajal S:** Texture of the nervous system of man and vertebrates (trans. Pasik P and Pasik T, from the 1899-1904 spanish edn) Springer, Vienna 1999.
- Ramón y Cajal S:** Degeneration and regeneration of the nervous system (trans. Day RM, from the 1913 spanish edn) Oxford Univ Press, London 1928.
- Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G:** Mitochondria, the killer organells and their weapons. *J Cell Phys* 2002 192:131-7.
- Reed JC:** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994 Jan;124(1-2):1-6.
- Reed JC:** Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997 Jun 19;387(6635):773-6.
- Reynolds BA, Weiss S:** Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992 Mar 27; 255 (5052): 1707-10.
- Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB:** The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981 13:511-18.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH:** Defying death after DNA damage. *Nature* 2000 Oct 12;407:777-83.

- Rochefort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM:** Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 2002 Apr 1;22(7):2679-89.
- Rondi-Reig L, Lemaigre-Dubreuil Y, Montecot C, Muller D, Martinou JC, Caston J, Mariani J:** Transgenic mice with neuronal overexpression of bcl-2 gene present navigation disabilities in a water task. *Neuroscience* 2001;104(1):207-15.
- Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A:** Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol* 1995 Jan 2;351(1):51-61.
- Samejima K, Tone S, Earnshaw WC:** CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* 2001 Nov 30;276(48):45427-32.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Dec;74(12):5463-7.
- Schaper A:** Die frühesten Differenzierungsvorgänge im Centralnervensystem. *Arch f Entw-Mech Organ* 1897 5:81-132.
- Schierle GS, Hansson O, Leist M, Nicotera P, Widner H, Brundin P:** Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* 1999 Jan;5(1):97-100.
- Schinstine M, Gage FH:** Factors affecting proviral expression in primary cells grafted into the CNS. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1993;71:311-23.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S:** Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 2003 Jan 3; 299:117-120.

- Shors TJ, Beylin AV, Wood GE, Gould E:** The modulation of Pavlovian memory. Behav Brain Res 2000 Jun 1;110(1-2):39-52.
- Stenman J, Toresson H, Campbell K:** Identification of two distinct progenitor populations in the lateral ganglionic eminence: implications for striatal and olfactory bulb neurogenesis. J Neurosci 2003 Jan 1;23(1):167-74.
- Sugita N:** Comparative studies on the growth of the cerebral cortex. J Comp Neurol 1918 29:61-117.
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH:** Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. Nature 1996 Oct 17; 383 (6601): 624-7.
- Takagi Y, Nozaki K, Takahashi J, Yodoi J, Ishikawa M, Hashimoto N:** Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. Brain Res 1999 Jun 12;831(1-2):283-7.
- Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E:** Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. J Neurosci 1999 Jul 15;19(14):5792-801.
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, Parnavelas JG:** Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. J Neurosci 1997 Feb 1;17(3): 1075-85.
- Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE:** Studies of necrosis in vitro of mouse hepatic parenchymal cells. Ultrastructural and cytochemical alterations of cytosomes, cytosegresomes, multivesicular bodies, and microbodies and their relation to the lysosome concept. Lab Invest 1965 Nov;14(11):1946-68.
- Tsujimoto Y, Shimizu S:** Bcl-2 family: life-or-death switch. FEBS Lett 2000 Jan 21;466(1):6-10.

- van Praag H, Kempermann G, Gage FH:** Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999 Mar;2(3):266-70.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH:** Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002 Feb 28;415(6875):1030-4.
- Wang J, Lenardo MJ:** Roles of caspases in apoptosis, development and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Sci* 2000 113:753-7.
- Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J:** Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 1994 Sep 9;78(5):739-50.
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D:** Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2002 Nov 22;298(5598):1587-92.
- Widlak P, Li LY, Wang X, Garrard WT:** Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNaseI. *J Biol Chem* 2001 Dec 21;276(51):48404-9.
- Weiler E, Farbman AI:** Mitral cell loss following lateral olfactory tract transection increases proliferation density in rat olfactory epithelium. *Eur J Neurosci* 1999 Sep;11(9):3265-75.
- Williams RW, Rakic P:** Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J Comp Neurol* 1988 278:344-352.
- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J, Kuhn HG:** Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2002 Nov;16(9):1681-9.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR:** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.

Zanjani HS, Vogel MW, Delhay-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J: Increased cerebellar Purkinje cell numbers in mice overexpressing a human bcl-2 transgene. *J Comp Neurol* 1996 Oct 21;374(3):332-41.

Zanjani HS, Vogel MW, Delhay-Bouchaud N, Martinou JC, Mariani J: Increased inferior olivary neuron and cerebellar granule cell numbers in transgenic mice overexpressing the human Bcl-2 gene. *J Neurobiol* 1997 May;32(5):502-16.

Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB: Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci* 1998 Jul;11(4):234-45.

Zupanc GK: Neurogenesis, cell death and regeneration in the adult gymnotiform brain. *J Exp Biol* 1999 May;202 (Pt 10):1435-46.

Eigene Veröffentlichungen

Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG: Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 2000 Sep 8;291(1):17-20.

Kuhn HG, Biebl M, Wilhelm D, Li M, Friedlander RM, Winkler J: Increased generation of granule cells in adult Bcl-2 overexpressing mice: A role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *Eingereicht*.

Biebl M, Kuhn HG, Winkler J: Influence of a caspase inhibitor on programmed cell death in zones of neurogenesis in the adult rat brain. *In Arbeit*.

VII. Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
AP	alkalische Phosphatase
as	<i>antisense</i>
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indoyl-Phosphat
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BO	Bulbus olfactorius
bp	Basenpaare
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
BT	Biotin
CAD	<i>caspase-activated DNase</i>
cDNA	chromosomale Desoxyribonukleinsäure
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dk	Esel
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat
EDTA	Ethyldiamin-N,N,N',N' - tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EndoG	Endonuklease G
EPL	äußere plexiforme Schicht
FGF-2	<i>fibroblast growth factor-2</i>
FITC	Fluorescein

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	Granulärzellschicht
GD	Gyrus dentatus
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i>
GL	Glomerulärschicht
hu	human
ICAD	<i>inhibitor of CAD</i>
IF	Immunfärbung
IGF-1	<i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
kb	Kilobase
LM-PCR	<i>ligation mediated-polymerase chain reaction</i>
M	molar
mM	millimolar
ms	Maus
n	Anzahl
N	Normal
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NSE	<i>neuron-specific enolase</i>
NT-3	Neurotrophin-3
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
OD	optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PSA-NCAM	<i>polysialic acid-neural cell adhesion molecule</i>
rb	Kanninchen
RHOX	Rhodamin X

RMS	rostraler migratorischer Strom
RNA	Ribonukleinsäure
rt	Ratte
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription- polymerase chain reaction</i>
s	<i>sense</i>
sh	Schaf
SVZ	subventrikuläre Zone
TdT	terminale Transferase
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling</i>
U	Einheit
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot

Erst zweifeln, dann untersuchen, dann entdecken

(Henry Thomas Buckle, 1821-62)

Bei diesem Prozess und der Anfertigung dieser Arbeit wurde ich von vielen Personen unterstützt. Diesen Leuten gilt mein besonderer Dank:

Prof. Dr. Stephan Schneuwly und *Prof. Dr. Jürgen Winkler* für die Betreuung dieser Arbeit. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft, ihr großes Interesse und ihre vielen wertvollen Anregungen waren mir eine große Hilfe und gaben immer wieder wichtige Impulse, die für das Gelingen dieser Arbeit ausschlaggebend waren.

Prof. Dr. Ulrich Bogdahn für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Forschungen.

PD Dr. Georg Kuhn für die Einweihung in die Kunst der Immunhistologie und Stereologie, sowie die Bereitschaft mich von seinem reichhaltigen Erfahrungsschatz profitieren zu lassen.

Dr. Ludwig Aigner, Dr. Rainer Apfel und *Dr. Gerhard Giegerich*, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin *Dr. Daniel Wilhelm* für die Unterstützung bei der Erstellung der Bcl-2 Daten.

Sämtlichen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe (Neurologie) für die meist gute Stimmung im Labor.

Meinen jetzigen Kolleginnen und Kollegen der Profos AG, die mich in besonders anstrengenden Phasen aufgemuntert haben, trotz beruflicher Anforderungen, diese Promotion abzuschließen.

Allen Ungenannten, die mir auf irgendwelche Weise bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Manfred Biebl